



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελάνωμα: Γενετική, επιγενετική και νέες θεραπείες»

**ΓΚΟΥΝΤΟΥΡΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος)

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«MELANOMA: GENETICS, EPIGENETICS AND NEW
TREATMENTS»**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κακόηθες μελάνωμα είναι ένας από τους πιο επιθετικούς και ανθεκτικούς στη θεραπευτική αντιμετώπιση τύπους καρκίνου. Αποτελεί ασθένεια με έγκαιρη συνήθως διάγνωση, στην οποία έχουν δοκιμαστεί διάφορες στρατηγικές αντιμετώπισης. Τα τελευταία χρόνια έχει αποκαλυφθεί μια χιονοστιβάδα ανακαλύψεων στον τομέα του μελανώματος, που εκτείνονται από την κατανόηση της μοριακού υποβάθρου της ασθένειας έως την ανάπτυξη νέων θεραπειών με αδιαμφισβήτητο κλινικό όφελος. Οι εξελίξεις στη γενωμική τεχνολογία αλλά και στη μοριακή βιολογία έχουν επιταχύνει την ταυτοποίηση πολλαπλών γενετικών τόπων, αλλά και γονιδίων με άμεση συσχέτιση με το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης του κακοήθους μελανώματος. Το μελάνωμα χαρακτηρίζεται από μεγάλου βαθμού ετερογένεια. Η κατανόηση των μοριακών και γενετικών ερεισμάτων των υποομάδων των ασθενών θα βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών. Η ανάλυση του γενετικού υποβάθρου του μελανώματος σε επίπεδο μονογονιδιακό έχει πραγματοποιηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες, δίνοντας μία σαφή εικόνα των κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν τόσο την έναρξη όσο και την εξέλιξη του μελανώματος. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων πέντε ετών η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και μεθόδων, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing- NGS) ενεργοποίησε έναν πιο ολοκληρωμένο έλεγχο μεταλλάξεων σε επίπεδο πολυγονιδιακών πάνελ, γονιδιώματος και πρωτεώματος. Επίσης μελέτες πληθυσμού GWAS (Genome- Wide Association Studies) ταυτοποίησαν τους γενετικούς ρυθμιστές του μελανώματος, δίνοντας μια πιο πλήρη εικόνα του γενωμικού υποβάθρου του μελανώματος. Τα γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί είναι αθροιστικά υπεύθυνα για περίπου 50% των περιπτώσεων του οικογενούς μελανώματος.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μια πολυδιάστατη εμπλοκή πολλαπλών επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, της ρύθμισης της δομής της χρωματίνης, αλλά και των διαφόρων δραστηριοτήτων των μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs & lncRNAs). Νέες θεραπείες ιδιαίτερα για το προχωρημένο μελάνωμα, που βασίζονται στη θεραπεία του γονιδίου στόχου αλλά και στη διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού (ανοσοθεραπεία), βελτίωσαν το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών, εξατομικεύοντας τη θεραπεία. Ωστόσο προέκυψαν προκλήσεις που αφορούν την τοξικότητα των νέων θεραπειών και την ανθεκτικότητα του οργανισμού. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βιβλιογραφική μελέτη και ανασκόπηση των γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών που διέπουν το μελάνωμα, καθώς και των εξελίξεων στις νέες θεραπείες αντιμετώπισης του.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive and treatment-resistant human cancers. It is a disease that, due to the presence of melanin pigment, was accurately diagnosed earlier than most other malignancies and that has been subjected to countless therapeutic strategies. Discoveries reported in recent years have revealed a near avalanche of breakthroughs in the melanoma field- breakthroughs that span fundamental understanding of the molecular basis of the disease all the way to new therapeutic strategies that produce unquestionable clinical benefit. Advances in genomic technologies and molecular biology have accelerated the identification of multiple genetic loci that confer risk for cutaneous melanoma. Melanoma shows a high degree of heterogeneity, suggesting the existence of patient subgroups defined by specific genetic alterations. Understanding the genetic and molecular underpinnings of these subgroups will be necessary for the development of new therapies. Somatic mutation analysis of melanoma has been performed at the single gene level extensively over the past several decades. This has provided considerable insight into the critical pathways controlling melanoma initiation and progression. During the last five years, next-generation sequencing (NGS) has enabled even more comprehensive mutational screening at the level of multigene panels, exomes and genomes. These studies have uncovered many new and unexpected players in melanoma development. Population-based genome-wide association studies (GWAS) have been particularly informative at defining the relevant melanoma risk regions. Analyses of genomic changes in melanoma have identified key regulators of melanoma initiation and progression. Genes that have been identified are responsible as a combined total for approximately 50% of familial melanoma cases.

However, recent studies have revealed a complex involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression, including methylation, chromatin modification and remodeling, and the diverse activities of non-coding RNAs (miRNAs & lncRNAs). New therapies for advanced melanoma, based on gene-targeted therapies or stimulation of immune responses, have led to major advances, which, for the first time, showed improved survival for patients with this very challenging neoplasm. However, these treatments are not without challenges in terms of resistance and toxicity. This study is a bibliographic review of the genetic and epigenetic mechanisms underlying melanoma, as well as developments in new treatments.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ

2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ– ΚΛΕΙΔΙΑ

2.1.1 BRAF

2.1.2 PTEN

2.1.3 C- KIT

2.1.4 EGFR

2.1.5 C- Met

2.1.6 MITF

2.1.7 CDKN2A

2.1.8 CDK4

2.1.9 CCND1

2.1.10 MC1R

2.1.11 BAP1

2.1.12 ACD & TERF2IP

2.1.13 POT1

2.1.14 TERT

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

3.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

3.3 ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

3.3.1 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (MiRNAs)

3.3.2 ΜΑΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (lncRNAs)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ- ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

4.1 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΗ

4.2 ΒΙΟΨΙΑ

4.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

4.4 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

4.5 ΒΙΟΨΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ ΦΡΟΥΡΟΥ (SLNB)

4.6 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

4.8 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

4.9 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.10 ΣΤΟΧΕΥΟΥΣΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

4.11 ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.11.1 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

4.11.2 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

4.12 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΙΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κακόηθες μελάνωμα αποτελεί ένα δυνητικά μοιραίο δερματικό καρκίνωμα, το οποίο προέρχεται από τα μελανοκύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Τα κύτταρα που παράγουν χρωστική εμφανίζονται φυσιολογικά στην επιδερμίδα και μερικές φορές στο χόριον και προστατεύουν το δέρμα από τις επιπτώσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το κακόηθες μελάνωμα θεωρείται ως ένας εκ των πιο επιθετικών αλλά και ανθεκτικών στη θεραπεία όγκων στους ανθρώπους.

Η συχνότητα εμφάνισης του μελανώματος τις τελευταίες δεκαετίες έχει την τάση να αυξάνει. Οι επισκέψεις στον ιατρό για εκτίμηση δυνητικά σχετιζόμενων με το κακόηθες μελάνωμα βλαβών, συνεχώς πολλαπλασιάζονται. Η επίπτωση εμφάνισης του κακοήθους μελανώματος αυξάνεται ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες κυρίως στους Καυκάσιους πληθυσμούς. Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο όγκος προσβάλλει περίπου 63000 άτομα το χρόνο, με την ετήσια θνησιμότητα να υπολογίζεται στο 2,3% για όλες τις φυλές και στο 2,8% στη λευκή φυλή. Στο Ηνωμένο Βασίλειο η συχνότητα εμφάνισης είναι 5 νέες περιπτώσεις ανά 100000 κατοίκους. Αποτελεί παγκοσμίως τον πέμπτο πιο συχνό καρκίνο στους άνδρες (5% των καρκίνων) και τον έκτο πιο συχνό στις γυναίκες (4% των καρκίνων). Ο όγκος μπορεί να προσβάλλει ενήλικες όλων των ηλικιών, ακόμα και νεαρά άτομα (ξεκινώντας στο μέσο της εφηβείας). Είναι πολύ σπάνιο σε παιδιά κάτω των 10 ετών. Το 66% των ασθενών είναι ηλικίας 15- 64 ετών με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 53 έτη. {1}

Η κλινική έκβαση του μελανώματος έχει άμεση σχέση με το στάδιο της διάγνωσης της νόσου. Στο ένα άκρο του φάσματος βρίσκεται το πρωτοπαθές κακόηθες μελάνωμα, το οποίο με την κατάλληλη εκτομή έχει υψηλότητα ποσοστά ίασης. Ωστόσο στο άλλο άκρο, το μεταστατικό μελάνωμα έχει πολύ κακή πρόγνωση παρά τη θεραπευτική αντιμετώπιση, με αποτέλεσμα ασθενείς σταδίου IV να έχουν προσδόκιμο επιβίωσης τα 5 έτη σε ποσοστό 9-15%.

Η ανάπτυξη του μελανώματος γίνεται στις περισσότερες των περιπτώσεων de novo σε δέρμα που προηγουμένως ήταν φυσιολογικό. Ενώ παλαιότερες απόψεις θεωρούσαν το κακόηθες μελάνωμα αποτέλεσμα της υπερδιέγερσης των μελανοκυττάρων από την υπεριώδη ακτινοβολία, πρόσφατες μοριακές και επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι η εμφάνιση του είναι αποτέλεσμα πολλαπλών αιτιολογικών παραγόντων και μονοπατιών μεταξύ των οποίων οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος. Στο σύνολο των περιπτώσεων του μελανώματος οικογενές θεωρείται το 10% αυτών.

Ως κύριος αιτιολογικός παράγων για την ανάπτυξη του μελανώματος έχει ενοχοποιηθεί η αυξημένη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, με τη θνησιμότητα να αυξάνει κατά 10% για

κάθε μείωση του γεωγραφικού πλάτους κατά 2%. Τα πιο ευπαθή άτομα θεωρούνται αυτά που έχουν ανοιχτόχρωμες επιδερμίδες, ερυθρά ή ξανθά μαλλιά, εφηλίδες και πτωχού βαθμού ικανότητα για μαύρισμα ή αυξημένη δυνατότητα πρόκλησης ηλιακού εγκαύματος. Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθους μελανώματος είναι η λευκή φυλή, το οικογενειακό ιστορικό (1 στους 10 ασθενείς με μελάνωμα έχει ένα μέλος της οικογένειας με μελάνωμα), η παρουσία ενός κλινικά άτυπου σπίλου (δυσπλαστικός σπίλος) ή ένας τεράστιος εκ γενετής μελανοκυτταρικός σπίλος (γιγαντιαίος), η παρουσία ενός υψηλότερου από το μέσο όρο αριθμού κανονικών μελανοκυτταρικών σπύλων, η ανοσοκαταστολή αλλά και πολλαπλοί γενετικοί παράγοντες. {2}

Η ταυτοποίηση των ατόμων με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη μείωση της θνητότητας, ενώ παράλληλα είναι απαραίτητη η ανάπτυξη προγραμμάτων πρόληψης αναφορικά με το κακόηθες μελάνωμα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών οι εξελίξεις στη μοριακή βιολογία, αλλά και στις τεχνολογίες έρευνας και μελέτης στο σύνολο του γονιδιώματος έχουν επιταχύνει την ταυτοποίηση πολλαπλών γενετικών τόπων, αλλά και συγκεκριμένων γονιδίων με άμεση συσχέτιση με το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης αλλά και την εξέλιξη του κακοήθους μελανώματος. Έχουν βρεθεί γονίδια με υψηλή και μέτρια διεισδυτικότητα και επικινδυνότητα. Οι μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν αποκαλύψει σημαντική εικόνα των κρίσιμων μονοπατιών που εμπλέκονται στην έναρξη αλλά και στην εξέλιξη του μελανώματος.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων πέντε ετών η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και μεθόδων, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing- NGS) ενεργοποίησε έναν πιο ολοκληρωμένο έλεγχο μεταλλάξεων σε επίπεδο πολυγονιδιακών πάνελ, γονιδιώματος και πρωτεώματος. Επίσης μελέτες GWAS (Genome- Wide Association Studies) ταυτοποίησαν τους γενετικούς ρυθμιστές του μελανώματος, δίνοντας μια πιο πλήρη εικόνα των περιοχών αλλά και των αλλαγών που συσχετίζονται με το κακόηθες μελάνωμα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μια πολυδιάστατη εμπλοκή πολλαπλών επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, της ρύθμισης της δομής της χρωματίνης, αλλά και των διαφόρων δραστηριοτήτων των μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs & lncRNAs). Η γένεση και εξέλιξη του μελανώματος προκύπτει από πολύπλοκες αλλαγές σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ικανότητα αποφυγής της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου και της απόπτωσης.

Σημαντικό ρόλο παίζει η ανάπτυξη των κατάλληλων προγνωστικών παραγόντων του μελανώματος. Ο πιο σημαντικός είναι το στάδιο της στιγμής της παρουσίασης. Το

αναθεωρημένο AJCC (American Joint Committee on Cancer) {3} σύστημα σταδιοποίησης για το μελάνωμα βασίζεται στο βάθος του αρχικού μικροσκοπικού όγκου (πάχος κατά Breslow - Πίνακας 1), στην παρουσία εξέλκωσης, στην ένδειξη αδενικής συμμετοχής και στην παρουσία μεταστατικής νόσου σε εσωτερικές θέσεις. Το μελάνωμα μπορεί να υποτροπιάσει μετά από μερικά χρόνια. Περίπου το 10-15% των πρώτων υποτροπών αναπτύσσονται σε >5 έτη μετά τη θεραπεία της αρχικής βλάβης. Ο χρόνος υποτροπής ποικίλλει αντίστροφα με το πάχος του όγκου. Ένα εναλλακτικό προγνωστικό σχήμα (Πίνακας 2) για τα κλινικά στάδια μελανώματος Ι και ΙΙ, προτεινόμενο από τον Clark, βασίζεται στο ανατομικό επίπεδο διήθησης του δέρματος. Το επίπεδο Ι είναι ενδοεπιδερμικό (in situ). Το επίπεδο ΙΙ διαπερνά το θηλώδες χόριο. Το επίπεδο ΙΙΙ ξεπερνάει το θηλώδες χόριο. Το επίπεδο ΙV διαπερνά το δικτυωτό χόριο και το επίπεδο V διαπερνά το υποδόριο λίπος. Τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης για αυτά τα στάδια

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. {2}	
Πενταετής επιβίωση σε σχέση με πάχος βλάβης κατά Breslow	
Πάχος κατά Breslow (mm)	Πενταετής επιβίωση (%)
<1,5	93
1,5- 3,5	67
>3,5	37
Πάχος κατά Breslow: από την κοκκώδη στιβάδα της επιδερμίδας μέχρι τα πιο βαθιά εντοπιζόμενα κύτταρα του όγκου στο χόριο	

είναι κατά μέσο όρο 100, 95, 82, 71 και 49 αντίστοιχα. {2}

Τα μελανώματα μπορούν να επεκταθούν μέσω των λεμφικών καναλιών ή του αίματος. Οι πρώιμες μεταστάσεις είναι συχνές στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Το ήπαρ, οι πνεύμονες, τα οστά και ο εγκέφαλος είναι συνηθισμένες θέσεις αιματογενούς διασποράς, αλλά ασυνήθιστες θέσεις όπως ο πρόσθιος θάλαμος του οφθαλμού μπορεί επίσης να προσβληθούν. Η αντιμετώπιση είναι σχεδόν απίθανη όταν εγκατασταθεί η μεταστατική νόσος.

Η αντιμετώπιση του μελανώματος αποτελεί πρόκληση για την ιατρική κοινότητα. Έχουν χρησιμοποιηθεί: χειρουργική αντιμετώπιση, η βιοψία λεμφαδένα φρουρού (SLNB) που

αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη, η βοηθητική θεραπεία με ινερφερόνη (IFN α2b), χημειοθεραπεία, βιολογικές θεραπείες (δακαρβαζίνη, ανάλογα πλατίνας, νιτροζουρίες), χρήση καθαρών καρκινικών πρωτεϊνών ως ανοσογόννα και χρήση γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων, με σκοπό την απόσπαση απάντησης από τα Τ κύτταρα, μονοκλωνικά αντισώματα για τα καρκινικά αντιγόνα και παράγοντες έναντι των οδών του κυτταρικού κύκλου.

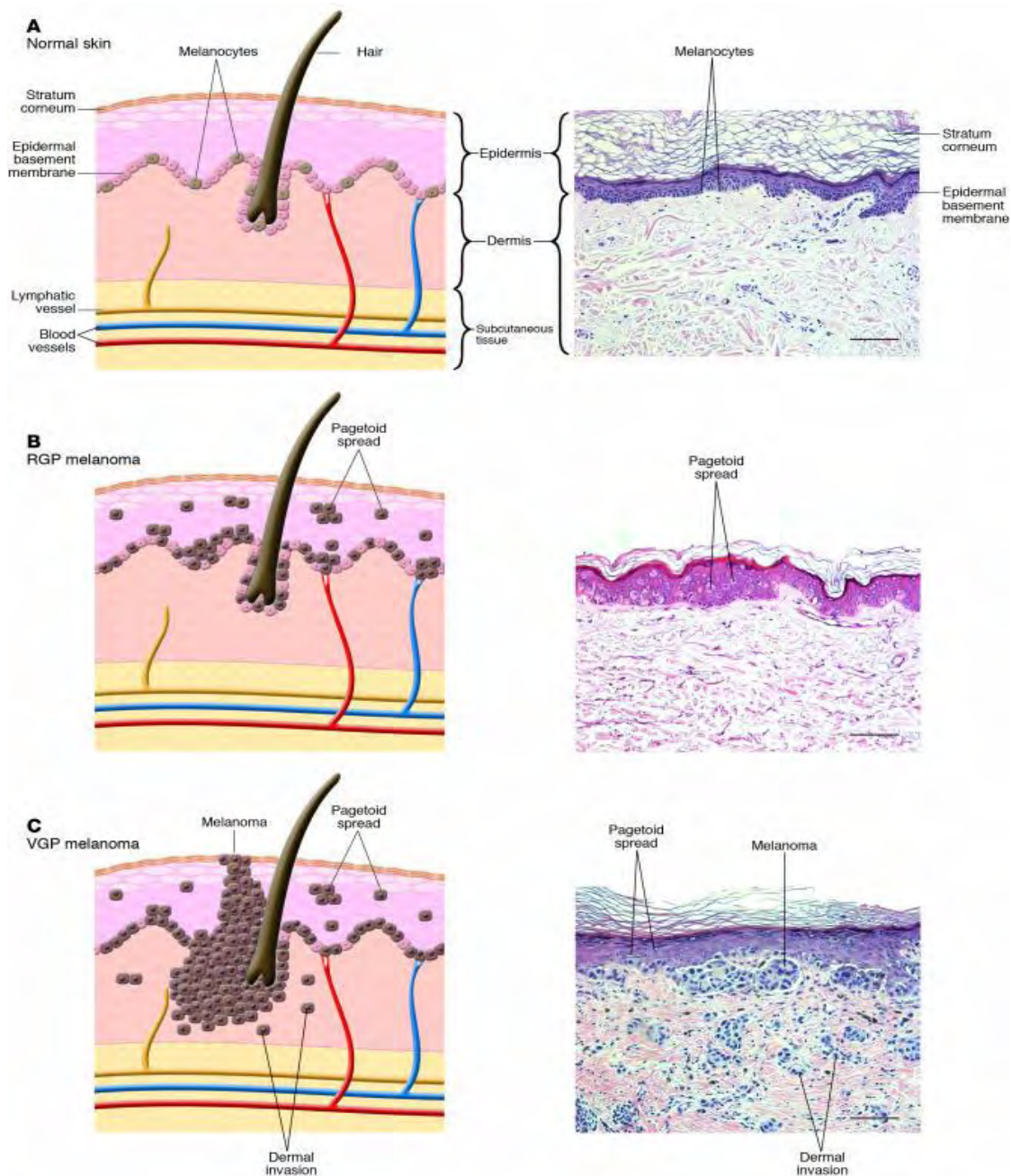
Νέες θεραπείες αναπτύχθηκαν, ιδιαίτερα για το προχωρημένο μελάνωμα, οι οποίες οδήγησαν σε μεγάλες αλλαγές στον τρόπο αντιμετώπισης των ασθενών, βελτιώνοντας αισθητά το προσδόκιμο επιβίωσης τους. Αυτές οι νέες θεραπείες βασίζονται στη θεραπεία του γονιδίου στόχου αλλά και στη διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού (ανοσοθεραπεία), εξατομικεύοντας τη θεραπεία για κάθε ασθενή. Ωστόσο προέκυψαν προκλήσεις που αφορούν την ανθεκτικότητα του οργανισμού στις νέες θεραπείες αλλά και τοξικότητα αυτών, τις οποίες πρέπει οι θεράποντες να γνωρίζουν ώστε να πετύχουν το βέλτιστο για τον ασθενή αποτέλεσμα. Σημαντική υπό διερεύνηση παράμετρος αποτελεί και ο συνδυασμός των υπαρχόντων και των νέων θεραπειών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συσχέτιση μεταξύ βαθμού διήθησης και πρόγνωσης {2}

Επίπεδα κατά Clark που συσχετίζουν την επιβίωση με το βάθος διήθησης

Επίπεδο	Βάθος διήθησης του χορίου
1	In situ (μέσα στην επιδερμίδα)
2	Διήθηση θηλώδους χορίου
3	Διήθηση στο συνδετικό όριο θηλώδους και δικτυωτού χορίου
4	Διήθηση του δικτυωτού χορίου
5	Διήθηση υποδορίου λίπους

Επίπεδα κατά Clark. Η πρόγνωση θεωρείται καλή για τα επίπεδα 1 και 2, αλλά σημαντικά πτωχότερη από το 3 έως το 5



ΕΙΚΟΝΑ 1. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ {4}

(Α) Φυσιολογικό δέρμα

(Β) RGP (radial growth face) in situ μελάνωμα (ενδοεπιδερμικό κακήθες)

Παρατηρούνται διάσπαρτα (σαν σκάγια από κυνηγητική καραμπίνα) μέσα στην υπερπλαστική επιδερμίδα, άτυπα ευμεγέθη μελανοκύτταρα με άφθονο , ωχρο κύτταρόπλασμα και υπερχρωματικούς πυρήνες

(C) VGP (vertical growth phase) κακήθες μελάνωμα

Τα μελανοκύτταρα παρουσιάζουν «παγετοειδή» διασπορά, έχοντας διεισδύσει στο δερματο-επιδερμικό σύνδεσμο. Παρατηρείται Κυτταρολογική ατυπία.

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Υπάρχουν τέσσερεις τύποι δερματικού μελανώματος. Στους τρεις από αυτούς – επιφανειακά επεκτεινόμενο μελάνωμα, κακόηθες μελάνωμα σε έδαφος κακοήθους φακής και το μελάνωμα των άκρων - η βλάβη έχει μία περίοδο επιφανειακής (αποκαλείται ακτινική) ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της οποίας αυξάνεται σε μέγεθος αλλά δεν διαπερνάει σε βάθος. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου το μελάνωμα μπορεί να θεραπευτεί με χειρουργική εκτομή. Ο τέταρτος τύπος - οζώδες μελάνωμα - δεν έχει αναγνωρίσιμη φάση ακτινωτής ανάπτυξης και συνήθως εμφανίζεται σαν μια βαθειά διηθητική βλάβη, ικανή για πρόωρη μετάσταση. Όταν οι όγκοι αρχίζουν να διαπερνούν βαθειά το δέρμα, είναι στην αποκαλούμενη φάση της κάθετης ανάπτυξης. Τα μελανώματα με φάση ακτινικής ανάπτυξης χαρακτηρίζονται από ακανόνιστα και μερικές φορές από διακοπτόμενα όρια, ποικιλία στον τρόπο κατανομής του χρώματος αλλά και ποικιλία στο χρώμα. Μία αύξηση στο μέγεθος ή αλλαγή στο χρώμα παρατηρείται στο 70% των πρόωρων βλαβών. Αιμορραγία, εξέλκωση και άλγος αποτελούν μεταγενέστερα σημεία και έχουν μικρότερη αξία στην πρόωμη διάγνωση. Το επιφανειακά επεκτεινόμενο μελάνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος που παρατηρείται στο λευκό πληθυσμό. Τα μελανώματα που προέρχονται από δυσπλαστικούς σπίλους είναι συνήθως αυτού του τύπου. Η ράχη είναι η πιο συνηθισμένη θέση μελανώματος στους άνδρες. Στις γυναίκες η ράχη και το πόδι (από το γόνατο ως τον αστράγαλο) είναι οι συνηθισμένες θέσεις εμφάνισης. Τα οζώδη μελανώματα είναι από σκούρα καφέ – μαύρα ως μπλε - μαύρα οζίδια. Το κακόηθες μελάνωμα σε έδαφος φακής περιορίζεται σε θέσεις με χρόνια ηλιακή βλάβη και ηλιακή έκθεση (πρόσωπο, λαιμός, οπίσθια πλευρά χεριού) σε ηλικιωμένα συνήθως άτομα. Το μελάνωμα των άκρων εμφανίζεται κυρίως στις παλάμες, στα πέλματα, κάτω από τα νύχια και στους βλεννογόνους. Ενώ αυτός ο τύπος εμφανίζεται και στους λευκούς, είναι πιο συχνός (μαζί με το οζώδες μελάνωμα) στους μαύρους πληθυσμούς και στους ανατολικούς Ασιάτες. {1}, {2}

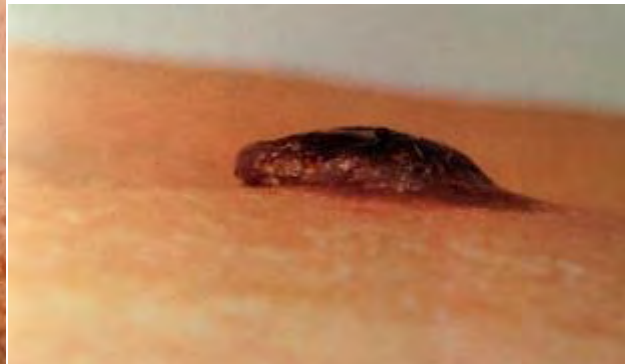
Ένας πέμπτος τύπος μελανώματος, το δεσμοπλαστικό μελάνωμα, αναγνωρίζεται. Αυτός ο τύπος όγκου σχετίζεται με ινώδη απάντηση στον όγκο, νευρική διήθηση και υψηλή τάση για τοπική υποτροπή. Περιστασιακά, τα μελανώματα μπορεί να είναι αμελανωτικά, στην οποία περίπτωση η διάγνωση συνίσταται στην ιστολογική εξέταση μετά από βιοψία ενός νέου ή αλλαγμένου δερματικού οζιδίου ή εξαιτίας της υποψίας βασικοκυτταρικού καρκινώματος. {1}, {2}

i) Επιφανειακά επεκτεινόμενο μελάνωμα (Εικόνες 2,3. φάση οριζόντιας επέκτασης- φάση κάθετης ανάπτυξης):

Αποτελεί τη συχνότερη μορφή (70%), είναι μέτριας κακοήθειας και εντοπίζεται πιο συχνά στην πλάτη στους άνδρες και στα κάτω άκρα στις γυναίκες. Μακροσκοπικά, είναι μία επίπεδη, ασύμμετρη βλάβη με ασαφή όρια, ποικιλοχρωμία και ανώμαλο περίγραμμα. {1}, {2}



ΕΙΚΟΝΑ 2



ΕΙΚΟΝΑ 3

ii) Μελάνωμα τύπου κακοήθους φακής (Εικόνες 4,5,6):

Αναπτύσσεται συχνότερα στην κεφαλή και τα άνω άκρα των ηλικιωμένων. Εμφανίζει ανώμαλα όρια και υπερμελάγχρωση, ενώ σε παραμελημένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανίσει οζίδια. {1}, {2}



ΕΙΚΟΝΑ 4



ΕΙΚΟΝΑ 5



ΕΙΚΟΝΑ 6

iii) Μελάνωμα των άκρων: Είναι μία σχετικά σπάνια μορφή μελανώματος (10%) πολύ υψηλής κακοηθείας που εμφανίζεται στις παλάμες, τα πέλματα και κάτω από τα νύχια. Στα νύχια εκδηλώνεται συχνά υπό μορφή γραμμοειδούς μελανωνυχίας. Πιο συχνός τύπος στη μαύρη φυλή και τους ανατολικούς Ασιάτες. {1}, {2}

iv) Οζώδες μελάνωμα (Εικόνα 7)

Πρόκειται για υψηλής κακοηθείας όγκο, αποτελεί το 15% των μελανωμάτων και εμφανίζεται κυρίως στους άνδρες μέσης ηλικίας στον κορμό ή στα άκρα και κλινικά παρουσιάζεται σαν σκουρόχρωμο οζίδιο. Αποτελεί βαθιά διηθητική βλάβη, ικανή για πρόωρη μετάσταση. {1}, {2}



ΕΙΚΟΝΑ 7

v) Δεσμοπλαστικό μελάνωμα (Εικόνα 8):

Σχετίζεται με ινώδη απάντηση στον όγκο, νευρική διήθηση και υψηλή τάση για τοπική υποτροπή. {1}, {2}



ΕΙΚΟΝΑ 8

2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Γενετικοί, φαινοτυπικοί και περιβαλλοντικοί παραγοντες κινδύνου συνεισφέρουν στην προδιάθεση για εμφάνιση μελανώματος. Περίπου 10% των ασθενών με μελάνωμα αναφέρουν τουλάχιστον έναν συγγενή, που πάσχει από μελάνωμα. Ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό είναι συνδεδεμένο με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. {5}

Σημαντικές μοριακές αλλαγές οδηγούν σε κακοήγη εξαλλαγή των μελανοκυττάρων. Γενικά, μεταλλάξεις στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, καθώς και στα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι αναγκαίες, ώστε να αναπτυχθεί το μελάνωμα. Η πλειονότητα των μεταβολών στις οποίες βασίζεται το γενετικό υπόβαθρο της ασθένειας εμφανίζονται ως τυχαίες μεταλλάξεις εντός των μελανοκυττάρων. Ένα σύνολο αλλαγών σε επίπεδο γονιδιώματος συμβάλλουν στη γένεση, ανάπτυξη και εξέλιξη των μελανωματικών βλαβών. Η παρουσία κληρονομικών παραλλαγών βλαστικής σειράς αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα εμφάνισης μελανώματος. {6}, {7}

Τα γονίδια - κλειδιά που προδιαθέτουν για κακόηθες μελάνωμα διαχωρίζονται και ομαδοποιούνται σε χαμηλής, μέτριας και υψηλής διεισδυτικότητας γονίδια. Η διεισδυτικότητα των γονιδίων σχετίζεται με την πιθανότητα ο φορέας της μετάλλαξης στο συγκεκριμένο γονίδιο να εμφανίσει τη νόσο κατά τη διάρκεια της ζωής και αντανάκλα τη συνολική συσχέτιση των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών ενός γονιδίου με το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Επίσης τα γονίδια μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με άλλους παράγοντες κινδύνου, κυρίως περιβαλλοντικούς επηρεάζοντας και ενεργοποιώντας τα κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη γένεση και την εξέλιξη του μελανώματος. {7}, {8}, {9}

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες και αναλύσεις σωματικών μεταλλάξεων σε μονογονιδιακό επίπεδο, παρέχοντας μας μια σημαντική εικόνα των κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν την έναρξη και πρόοδο του μελανώματος. Την τελευταία πενταετία με τη βοήθεια μελετών NGS (Next Generation Sequencing) επετεύχθη screening μεταλλάξεων σε επίπεδο πολλαπλών γονιδιακών πάνελ και σε επίπεδο συνόλου γονιδιώματος. Σύγχρονες μελέτες (WGS- Whole Genome Sequencing, WES- Whole Exome Sequencing) έδρασαν καταλυτικά στην κατανόηση της παθογένεσης του μελανώματος. Μελέτες για την αλληλούχιση γονιδιακής έκφρασης αλλά και για τη μεθυλίωση στο σύνολο του γονιδιώματος και του πρωτεώματος συγκέντρωσαν ένα τεράστιο όγκο νέων

δεδομένων, διαφωτίζοντας περαιτέρω το γενετικό υπόβαθρο του πολύπλευρου αυτού τύπου καρκίνου. {6}, {7}, {8} , {9}

Το 2010 οι Pleasance et al. μέσω μελέτης WGS περιέγραψαν έναν κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων που σχετίζονται με το κακόηθες μελάνωμα, συγκρίνοντας την αλληλούχιση τόσο καρκινικών κυτταρικών σειρών όσο και φυσιολογικού ιστού. Αποκαλύφθηκε σαφής βλάβη του DNA η οποία σχείζεται με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (DNA damage- UV radiation). {10}, {11} Ακολούθησαν κι άλλες μελέτες κοορτής σε μεγαλύτερο εύρος ασθενών που επιβεβαίωσαν και ενίσχυσαν τα αρχικά αποτελέσματα. {12}, {13} Το 2013 οι Lawrence et al. και οι Alexandrof et al. μέσω μελετών WGS & WES, συγκρίνοντας το γενετικό υποβαθρο πολλών καρκινωμάτων έδειξαν πως στο κακόηθες δερματικό μελάνωμα υπάρχει μεγαλύτερη συσχέτιση με μεταλλάξεις (μεγαλύτερη επιβάρυνση) σε σχέση με τα άλλα καρκινώματα που μελετήθηκαν. {14}, {15} Το 2015 πραγματοποιήθηκε μελέτη- ορόσημο από την κοινοπραξία TCGA (The Cancer Genome Atlas), η οποία περιέγραψε τη γενωμική αρχιτεκτονική 333 δερματικών μελανωμάτων, πραγματοποιώντας πλήρη και διεξοδική ανάλυση των γονιδίων και των μεταλλάξεων τους που αποτελούν τα ερείσματα της γενετικής βάσης της νόσου. Στη μελέτη αυτή φάνηκε υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο μελάνωμα (μέσος όρος: 16,8 μεταλλάξεις/ Mb). Επίσης υπήρξε υψηλή συσχέτιση με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία τόσο στα πρωτοπαθή (76%) όσο και στα μεταστατικά μελανώματα (84%). {9}, {16}

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΣΥΝΟΨΗ ΜΕΛΕΤΩΝ WGS & WES ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ {9}

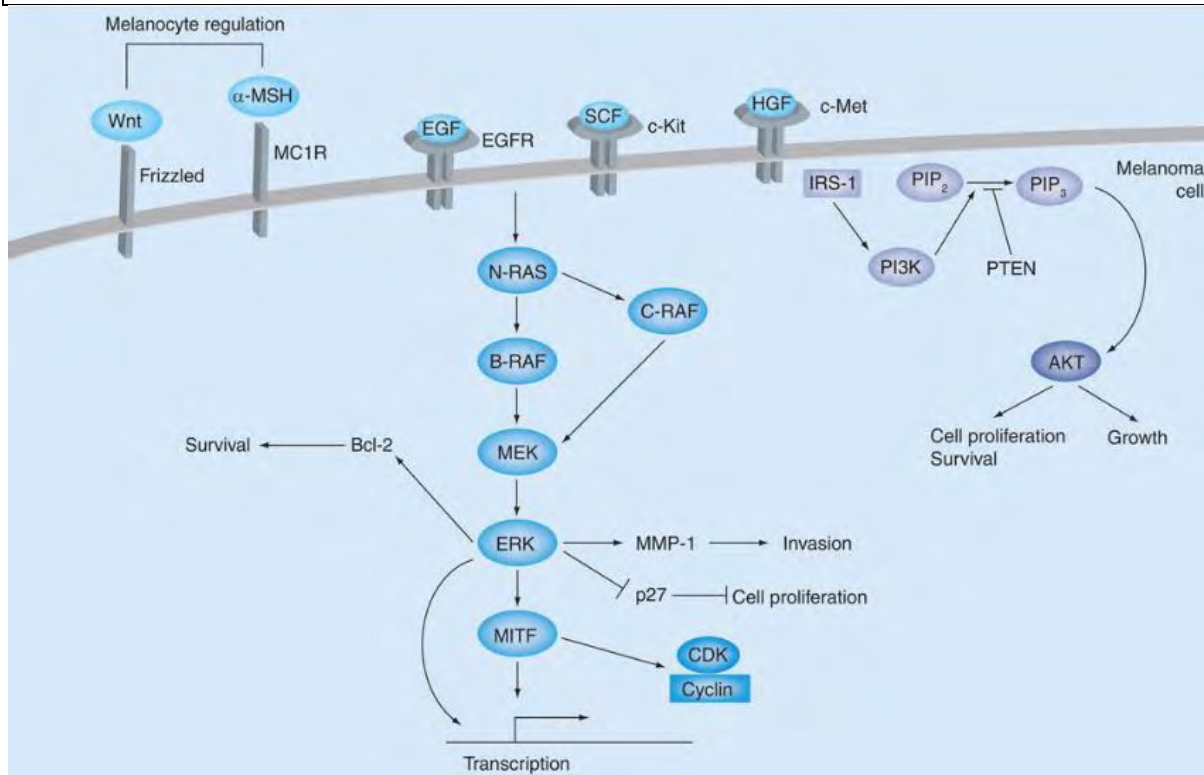
Publication	Number of OM Patients§	Sample type	Study type (WES or WGS)	Novel gene(s) highlighted¶	Mutation prevalence in discovery paper (%)	cBioPortal mutation frequency in TCGA/Broad/Vale datasets				Comments on discovery paper
						TCGA SKCM (N = 395)	Broad (N = 121)	Vale (N = 91)	Total (N = 557)	
Wei, X. et al. 2011	14	metastases	WES	GRN24 TRRAP	42.9% 5.0%	23.5% 11.9%	34.8% 14.0%	11.0% 9.9%	21.7% 12.0%	Frequency only for TRRAP a Ser722Rfe given in discovery paper
Stark, M. S. et al. 2011	8	cell lines	WES	NAP1K3 MAP3K9	9.0% 15.0%	6.4% 8.4%	7.4% 5.8%	4.4% 5.5%	6.3% 7.6%	
Whitlow, S. I. et al. 2011	7	cell lines	WES	NAP2K1 MAP2K2	6.3% 1.9%	5.2% 2.0%	5.0% 3.3%	0.0% 0.0%	4.3% 2.0%	
Berger, M. F. et al. 2012	23	metastases	WGS	PREK7	44.0%	22.0%	28.9%	17.6%	22.8%	Study also included 2 acral melanomas
Hodis, E. et al. 2012	121	15 primary tumors, 30 metastases and 76 short-term cultures derived from metastases	WES	RAC1	5.0%	6.1%	5.0%	7.7%	6.1%	
				PP6C	9.1%	7.5%	9.1%	8.8%	8.1%	
				ARID2	9.1%	13.3%	9.1%	11.0%	12.0%	
				STK19	4.1%	4.1%	4.1%	0.0%	3.4%	
				SNR1	6.6%	3.7%	6.6%	1.1%	3.6%	
Krauthammer, N. et al. 2012	73	metastases and short-term cultures derived from metastases	WES	TACC1	6.6%	2.6%	6.6%	1.1%	3.2%	Study composed 147 samples, with 99 having matched DNA. Of the latter, 14 were acral melanomas, 7 were mucosal melanomas, 5 were uveal melanomas and 73 were cutaneous melanomas.
				RAC1	9.8%	6.1%	5.0%	7.7%	6.1%	
				PP6C	13.1%	7.5%	9.1%	8.8%	8.1%	
				ARID2	18.0%	13.3%	9.1%	11.0%	12.0%	
				DDC	34.9%	20.3%	21.3%	25.3%	21.5%	
Wu, V. J. et al. 2013	34	primary tumors	WES	PTPRK	10.7%	11.3%	9.9%	14.3%	11.5%	
				ADTCH1	5.9%	3.8%	3.3%	0.0%	3.1%	
				KIT	8.8%	4.3%	3.3%	4.4%	4.1%	
Wu, V. J. et al. 2013	34	primary tumors	WES	WFI	17.7%	13.3%	13.2%	14.3%	13.5%	
Garner, J. J. et al. 2013	29	metastases	11 WGS & 18 WES	BCL2L12	8.4%	2.6%	0.0%	1.3%	2.2%	A synonymous mutation reported in discovery paper but only non-synonymous mutations listed in cBioPortal
Aydin, I. T. et al. 2014	8	metastases	WES	FBW7	8.1%	3.5%	3.3%	1.3%	3.4%	
Lu, C. et al. 2015	17	primary tumors	5 WGS & 12 WES	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Study was of childhood & adolescent melanomas and included 'conventional melanomas', Spitzoid melanomas and melanomas arising in congenital naevi. One patient also had an acral melanoma. WGS was carried out on fresh frozen specimens whereas WES was done on FFPE specimens
Wong, S. Q. et al. 2015	20	cell lines	WES	RQCD1	4.0%	2.9%	2.5%	3.3%	2.9%	RQCD1 mutation was found in 3 of 20 cell lines (15%), then prevalence of 4% derived from analysis of 715 primary melanomas
Ding, L. et al. 2015	13	metastases	WGS	EPH4	25.0%	9.9%	13.2%	7.7%	10.2%	15 metastases were from 13 patients
TCGA, 2015	331	266 metastases and 67 primary tumors	WES	BRAF	52.0%	51.3%	62.8%	37.4%	51.5%	From the list included here, IDH1 and DDIT3 are the only novel driver genes identified in the TCGA paper, which also listed another 38 significantly mutated genes by the MuSig method (Q<0.01), but not including previously highlighted genes such as PREK7, GRN24, and BCL2L12. The other 'known' melanoma driver genes are listed here in order to provide their mutation frequencies across the three largest melanoma WGS/WES studies
				NRAS	28.0%	27.8%	25.4%	28.9%	26.2%	
				CDKN2A	13.0%	13.3%	19.0%	1.1%	12.6%	
				TP53	5.0%	15.1%	29.0%	12.1%	15.4%	
				ARID2	14.0%	13.3%	9.1%	11.0%	12.0%	
				IDH1	5.7%	5.8%	2.5%	5.5%	5.0%	
				PP6C	7.0%	7.5%	9.1%	8.8%	8.1%	
				PTEN	8.5%	8.7%	11.6%	3.3%	8.4%	
				DDIT3	6.3%	6.1%	5.0%	0.0%	4.8%	
				RAC1	6.3%	6.1%	5.0%	7.7%	6.1%	
				NAP1K1	5.1%	5.2%	5.0%	0.0%	4.3%	
				WFI	4.0%	13.3%	13.2%	14.3%	13.5%	
				EBI	3.8%	3.5%	5.0%	0.0%	3.2%	
Krauthammer, N. et al. 2015	117	10 primary tumors, 6 metastases, 8 short-term cultures derived from primary tumors, 28 short-term cultures derived from metastases	WES	RAS42	4.2%	4.6%	4.1%	2.2%	4.1%	Study reports on 213 samples but 109 were also in the previous Krauthammer et al., publication, therefore the mutation frequencies are not completely independent. Matched normal DNA was available for 133 samples; 16 of which were from unknown melanoma histotype
				PTPRK1	3.8%	3.2%	0.8%	2.2%	2.5%	
				SOS1	6.6%	2.9%	4.1%	7.7%	3.9%	
				RAF1	2.3%	3.2%	1.7%	1.1%	2.5%	
				SPRED1	2.3%	1.4%	0.8%	1.1%	1.3%	
Shain, A. H. et al. 2015	20	primary tumors	low coverage WGS & high coverage WES	NRX3E	15.0%	0.3%	0.8%	0.0%	0.4%	All samples are desmoplastic melanomas and NRX3E mutations occur in the gene promoter
				EBI	11.0%	4.3%	5.0%	5.5%	4.7%	
				CDH1	19.0%	4.1%	5.0%	5.5%	4.5%	
				PSIP1	13.0%	3.5%	5.0%	1.3%	3.8%	
				ARID1A	22.0%	4.6%	11.6%	7.7%	6.6%	
				PLC3	19.0%	3.2%	3.3%	2.2%	3.1%	
Anelli, R. et al. 2015	501	see comments	36 WGS & 465 WES	SETD2	5.4%	5.2%	5.0%	5.5%	5.2%	Data are collected from various sources including TCGA
				RAS42	5.4%	4.6%	4.1%	2.2%	4.1%	Broad, VALE and others

2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ - ΚΛΕΙΔΙΑ

Σχεδόν σε όλα τα μελανώματα έχει ενεργοποιηθεί το μονοπάτι της MAP κινάσης (mitogen activated protein kinase pathway). Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε μία αλληλουχία γεγονότων τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Η οικογένεια RAS είναι κρίσιμης σημασίας διαμεσολαβητές (mediators) στη μετάδοση σημάτων ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού.

Σωματικές, σημειακές μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 15% των μελανωμάτων στο NRAS. Η σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο του NRAS οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της ανάλογης πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τη διαδοχική ενεργοποίηση κινάσων σερίνης θρεονίνης, η οποία συνεπάγεται την είσοδο σε συνεχιζόμενους κυτταρικούς κύλους, τη αλλαγή της μορφής του κυττάρου, καθώς και την αυξημένη επιβίωσή του. Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν συνεργικά με υπερενεργοποίηση ή υπερέκφραση διάφοροι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως το c-kit, ο EGFR και το c-Met. {6}, {17}, {18}

ΕΙΚΟΝΑ 9. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ {19}



Πολλαπλοί υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιήσουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK & PI3K, τα οποία είναι σημαντικοί «καταρράκτες» στο μελάνωμα που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και την κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 9). {19}, {20}

2.1.1 BRAF

Οι πιο σημαντικές κινάσες σερίνης θρεονίνης που μεταφέρουν το σήμα από το RAS είναι οι BRAF (serine/threonine protein kinase activating the MAP kinase/ ERK- signaling pathway) και CRAF που ενεργοποιούνται όταν προσδένονται στο RAS. Μετά την ενεργοποίηση του RAF, είτε με τη μορφή ομο- ή ετερο- διμερών ακολουθεί αλληλεπίδραση με τη MAPK/ Extracellular signal-regulated κινάση(ERK). Η φωσφορύλιωση της ανωτέρω MEK κινάσης οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ERK. Η ενεργοποιημένη ERK, με τη σειρά της, καθώς αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια μεταδίδει αυξητικά και μεταλλαξιογόνα σήματα και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλαπλών κακοηθειών (Εικόνα 9). {19} Η ενεργοποίηση του MAPK από τη CRAF μόνο δεν είναι εφικτή, διότι απαιτούνται περαιτέρω βήματα, σε αντίθεση με το BRAF. Για αυτό το λόγο έχουν ανευρεθεί μεταλλάξεις στο BRAF σε ποσοστό 40-50% των μελανωμάτων. Αντίθετα δεν έχουν περιγραφεί ανάλογες μεταλλάξεις στο CRAF. {19}, {21}

Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι οι μεταλλάξεις στο BRAF αποτελούν ένα επίκτητο γεγονός, το οποίο λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια του διηθητικού μελανώματος. Μεταλλάξεις στο BRAF (40-50%) ανιχνεύονται κατά την κάθετη ανάπτυξη και στα μεταστατικά μελανώματα, ενώ είναι σπανιότερες κατά την οριζόντια φάση ανάπτυξης, καθώς και στα *in situ* μελανώματα, οι οποίες θεωρούνται οι αρχικές προδιηθητικές καρκινικές βλάβες (10% και 6% αντίστοιχα). {19}, {21} Σε αντίθεση με ευρέως διαδεδομένες αντιλήψεις - βασισμένες στην εύρεση BRAF μεταλλάξεων στο 70-80% των δυσπλαστικών σπύλων-, η μετάλλαξη στο BRAF δεν αποτελεί το πρόδρομο ογκογενετικό γεγονός, αλλά μάλλον διευκολύνει την περαιτέρω κακοήγη εξαλλάγη. Όταν μετάλλαξη στο BRAF συμβαίνει, ενεργοποιούνται μηχανισμοί σχετιζόμενοι με την κυτταρική ανάπτυξη και την αναστολή της απόπτωσης, οδηγώντας σε επέκταση της νόσου. {19}, {20}, {22}, {23}

2.1.2 PTEN

Ένα άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο στις κακοήθειες και σχετίζεται με πολλαπλασιασμό των όγκων, επιβίωση και διήθηση είναι το PI3K/AKT μονοπάτι. Στο μελάνωμα, οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο PI3K σχετίζονται με το PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), μία φωσφατάση που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10q23, η οποία αναστέλλει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού (αρνητική ρύθμιση). {6}, {24} Απώλεια του PTEN ανιχνεύεται στο 30%- 40% των μελανωμάτων (στα πρωτοπαθή μελανώματα σε ποσοστό 10%) και σχετίζεται με ενεργοποίηση του Akt. Επάγει τη διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης επηρεάζοντας κι άλλες κυτταρικές λειτουργίες του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK. Μεταλλάξεις έχουν επίσης ανιχνευθεί σε μικρό ποσοστό (5%) στο PIK3CA, το οποίο είναι η καταλυτική υποομάδα του PI3K/AKT. {6}, {25}, {26}

Το μοτίβο των προαναφερθέντων μεταλλάξεων αποδεικνύει ότι η ταυτόχρονη ενεργοποίηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών είναι δυνατή στο μεταστατικό μελάνωμα. Εντούτοις έχει βρέθει ότι η μετάλλαξη στο NRAS είναι αλληλοαποκλειόμενη με μετάλλαξη στο BRAF και PTEN. {18}, {27}

Από την άλλη πλευρά, μεταλλάξεις στο PTEN συχνά απαντώνται σε όγκους με ταυτόχρονη BRAF μετάλλαξη, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα δύο συμβάματα είναι ισοδύναμα λειτουργικά με τα πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από μεταλλάξεις στο NRAS. Από πειράματα σε ινδικά χοιρίδια διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη στο BRAF V600E σχετίζεται με υπερλασία των μελανοκυττάρων, όχι όμως παρουσία διηθητικών βλαβών. Η συνύπαρξη όμως, τόσο μεταλλάξεων στο PTEN, όσο και στο BRAF οδήγησε σε παρουσία μεταστατικής διήθησης. Τα προαναφερθέντα πειράματα υποδηλώνουν την εν δυνάμει παρουσία συνέργειας μεταξύ των μεταλλάξεων BRAF και ενεργοποίησης του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού. {25}, {27} Αν και οι μεταλλάξεις στο BRAF και NRAS απαντώνται συχνά στα μελανώματα, περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός των μεταλλάξεων εξαρτάται από τους υπότυπους του μελανώματος. Το ποσοστό μεταλλάξεων BRAF μπορεί να αγγίξει το 60% σε δερματικά μελανώματα με διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο, αλλά σαφώς μικρότερα ποσοστά ανιχνεύονται στο μελάνωμα των άκρων (20%), στο μελάνωμα των βλεννογόνων (3%), καθώς και στο οφθαλμικό (0-0.5%) {22}

2.1.3 c-KIT

Προκαλεί ενδιαφέρον, ότι δερματικά μελανώματα με ενδείξεις χρόνιας έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία έχουν ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό μεταλλάξεων τόσο στο BRAF (5%) όσο και στο NRAS. Εντούτοις, από γονιδιακό έλεγχο προέκυψε ότι συχνά παρατηρείται ενίσχυση του γονιδίου c-KIT (KIT receptor tyrosine kinase). Το ποσοστό ενίσχυσης ή μεταλλάξεων στο c-kit κυμαίνεται από 20-40% στους προαναφερθέντες υποτύπους μελανωμάτων, ενώ η ανίχνευση είναι σχεδόν μηδενική σε δερματικά μελανώματα χωρίς δερματική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. {28} Το c-KIT δεσμεύεται με τον συνδετικό παράγοντα των βλαστοκυττάρων και η ενεργοποίηση του μπορεί να τονώσει τόσο το MAPK όσο και το PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση έχει υποδείξει ότι απώλεια του c-KIT συνδέεται με πρόοδο του μελανώματος. Κύτταρα μεταστατικού μελανώματος, στα οποία εκφράζεται το c-KIT παρουσιάζουν καλύτερη απόκριση στην απόπτωση που προκαλείται από τον παράγοντα των βλαστοκυττάρων. Τόσο σε μοντέλα ποντικών όσο και στους ανθρώπους απώλεια ή αναστολή του c-KIT οδηγεί σε απώλεια των μελανοκυττάρων, ενώ η ενεργοποίηση του συνδέεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση. {19}

2.1.4 EGFR

Όσον αφορά τον υποδοχέα αυξητικών παραγόντων EGFR (endothelial growth factor receptor), υπάρχουν αντιφατικά δεδομένα για το ρόλο του στο μελάνωμα. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7. Απώλεια του EGFR αναστέλλει την οδηγούμενη από RAS ογκογενετικότητα των μελανοκυττάρων (MAPK pathway). Σε απώλεια ετεροζυγωτίας ένα σήμα του EGFR οδηγεί σε κυτταρική επιβίωση μέσω PI3K ενεργοποίησης του AKT (PI3K- AKT pathway). FISH ανάλυση για τη γονιδιακή έκφραση του EGFR στο μελάνωμα έδειξε ότι η γονιδιακή ενίσχυση του συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση. Σε μελάνωμα με μετάλλαξη BRAF V600, η έκφραση του EGFR συνδέεται με αυξημένη επίκτητη αντοχή σε αναστολείς BRAF, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. {19}, {29}, {30}

2.1.5 c-MET

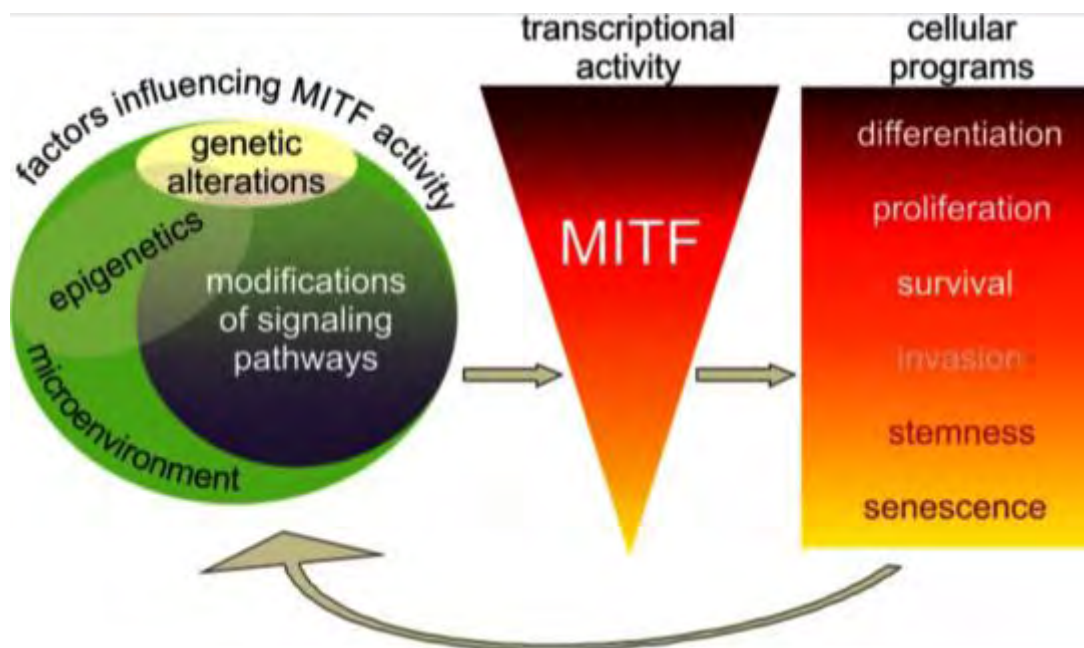
Αναφορικά με τον υποδοχέα τυροσίνης κινάσης c-MET (Met RTK), εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q33 και εκφράζεται στα μελανοκύτταρα. Ενεργοποιείται έπειτα από την

πρόσδεση του συνδέτη του (ligand). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την υπερέκφραση του σε μεταστατικό μελάνωμα. Παρά το γεγονός ότι συνήθως η ενεργοποίηση του είναι κυρίως παρακρινής, εντούτοις στο μελάνωμα παρουσιάζεται αυτοκρινής ενεργοποίηση του c-Met. {19} Ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) με αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό, κινητικότητα (motility), διεισδυτικότητα. Ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, με αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό, κυτταρική επιβίωση και αγγειογένεση. {31} Τέλος έχει ταυτοποιηθεί ως στόχος του παράγοντα που σχετίζεται με μικροφθalmία, ο οποίος ενισχύεται σε συγκεκριμένα μελανώματα. {19}

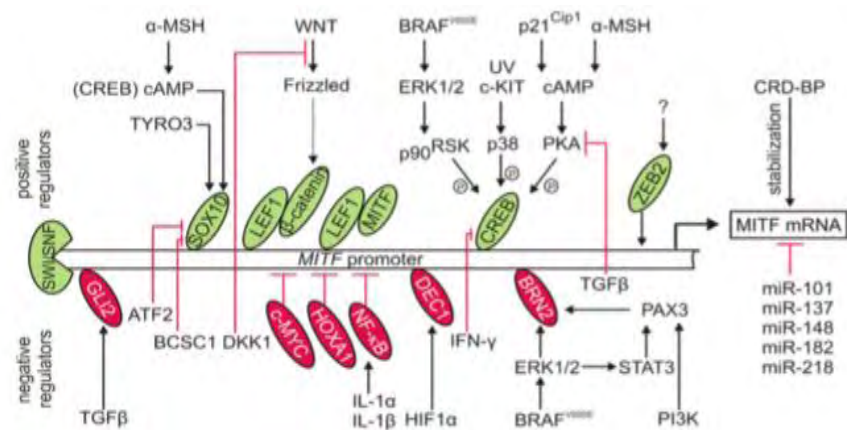
2.1.6 MITF

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στο μεταγραφικό παράγοντα MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) ο οποίος στη μη μεταλλαγμένη μορφή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή μελανίνης. Επίσης συμβάλλει στον κυτταρικό κύκλο στη διαφοροποίηση, στη μεταναστεύση και στην επιβίωση των μελανοκυττάρων. Όταν απορρυθμίζεται, όμως, μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση του μελανώματος. Η ενίσχυση του γονιδίου του MITF παρατηρείται σε περίπου 20% των μελανωμάτων και σχετίζεται με φτωχότερη πρόγνωση. {32} Μία ελαττωματική παραλλαγή του MITF (E318K) προσδίδει στα μελανοκύτταρα ένα φαινότυπο προ- κακοήθειας. Η ρύθμιση του MITF και της δράσης του γίνεται από μεταλλάξεις, μικροπεριβαλλοντικούς και επιγενετικούς παράγοντες καθώς και upstream ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών (διαφορετικοί συνδυασμοί τους επηρεάζουν την μεταγραφική δραστηριότητα του MITF και συνεπώς οδηγούν σε διαφορετικές «ικανότητες» των κυττάρων). {19} Τα κύτταρα του μελανώματος που εκφράζουν το MITF σε υψηλά επίπεδα μπορούν είτε να διαφοροποιηθούν, είτε να πολλαπλασιαστούν. Χαμηλά επίπεδα MITF συνδέονται με αυξημένη βλαστική ικανότητα, ενώ μακροπρόθεσμη καταστολή του MITF οδηγεί στην κυτταρική γήρανση. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού “Wnt/β-catenin pathway” (downstream ο MITF) (Η ενεργοποίηση του Wnt σηματοδοτεί θετικά το PI3K/AKT μονοπάτι. Όταν το μόριο Wnt συνδέεται με τον υποδοχέα Frizzled, μεταβιβάζεται σήμα για την καταστολή του ενζύμου GSK3b (Glycogen Synthetase Kinase-3b). Αυτό αποτρέπει τη φωσφορυλίωση και αποδόμηση του συμπλόκου β-κατενίνης, με αποτέλεσμα η β-κατενίνη να συσσωρεύεται στο πυρήνα, να συνδέεται με τον μεταγραφικό

παράγοντα LEF και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Συμμετέχει επίσης στο μονοπάτι MAPK. {33}, {34}, {35}, {36}



ΕΙΚΟΝΑ 10. Παράγοντες που ρυθμίζουν την μεταγραφική δράση του MITF και τα αποτελέσματά τους στον κυτταρικό προγραμματισμό {35}



ΕΙΚΟΝΑ 11. Μεταγραφική και μετα- μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του MITF
Θετική ρύθμιση (προώθηση έκφρασης) - Αρνητική ρύθμιση (αναστολή έκφρασης) {35}

Upstream ρυθμιστές των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να επηρεάσουν εμμέσως τα επίπεδα έκφρασης MITF. Το σύμπλεγμα SWI/SNF που επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης θετικός ρυθμιστής. Τα miRs αρνητικοί ρυθμιστές του μετάγραφου του MITF (mRNA), ενώ με τη βοήθεια του CRD-BP σταθεροποιείται το μετάγραφο του MITF. {35}, {36}

2.1.7 CDKN2A

Το γονίδιο CDKN2A (Cyclin- dependent kinase inhibitor 2A) αποτελεί γονίδιο με υψηλή διεισδυτικότητα στο κακόηθες μελάνωμα. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9p21. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν εντοπιστεί σε ποσοστό 25-50% των περιπτώσεων οικογενούς μελανώματος. Είναι γονίδιο που έχει μελετηθεί διεξοδικά τις περασμένες δεκαετίες. Γενετικός έλεγχος για το CDKN2A είναι διαθέσιμος, ωστόσο το Melanoma Genetics Consortium (www.genome.org) συστήνει διενέργεια του μόνο για ερευνητικά πρωτόκολλα. Για να συμπεριληφθεί κάποιος σε γενετικό έλεγχο και την επακόλουθη συμβουλευτική πρέπει να πληρούνται κάποια κριτήρια, όπως η παρουσία πολλαπλών μελανωμάτων στην ίδια οικογένεια, η παρουσία ασθενούς με παγκρεατικό καρκίνωμα σε οικογένεια επιρρεπή στα μελανώματα ή ακόμα και η παρουσία πολλαπλών πρωτοπαθών μελανωμάτων έστω και σε έναν ασθενή μιας οικογένειας. Ο κίνδυνος των μεταλλάξεων στο συγκεκριμένο γονίδιο ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, καθώς παρουσιάζεται αυξημένος σε περιοχές με αυξημένη ηλιακή έκθεση και συνεπώς έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι μεταλλάξεις στο CDKN2A έχουν ενοχοποιηθεί και για την παθογένεση άλλων κακοηθειών, όπως ο καρκίνος του παγκρέατος. {36}, {37}, {38}

Κωδικοποιεί 2 διαφορετικές πρωτεΐνες (p16INK4 & p14ARF), οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και στην επαγωγή της γήρανσης των μελανοκυττάρων. {37} Προσφάτως αποδείχθηκε η έντονη συσχέτιση της ανάπτυξης μελανώματος μέσω της απενεργοποίησης 2 ογκοκασταλτικών μονοπατιών:

- Μονοπάτι p16INK4a/ cyclin dependent kinases 4 & 6/ retinoblastoma protein (p16INK4a/ CDK 4,6/ pRb)
- Μονοπάτι p14ARF/ human double minute 2/ p53 (p14ARF/ HMD2/p53)

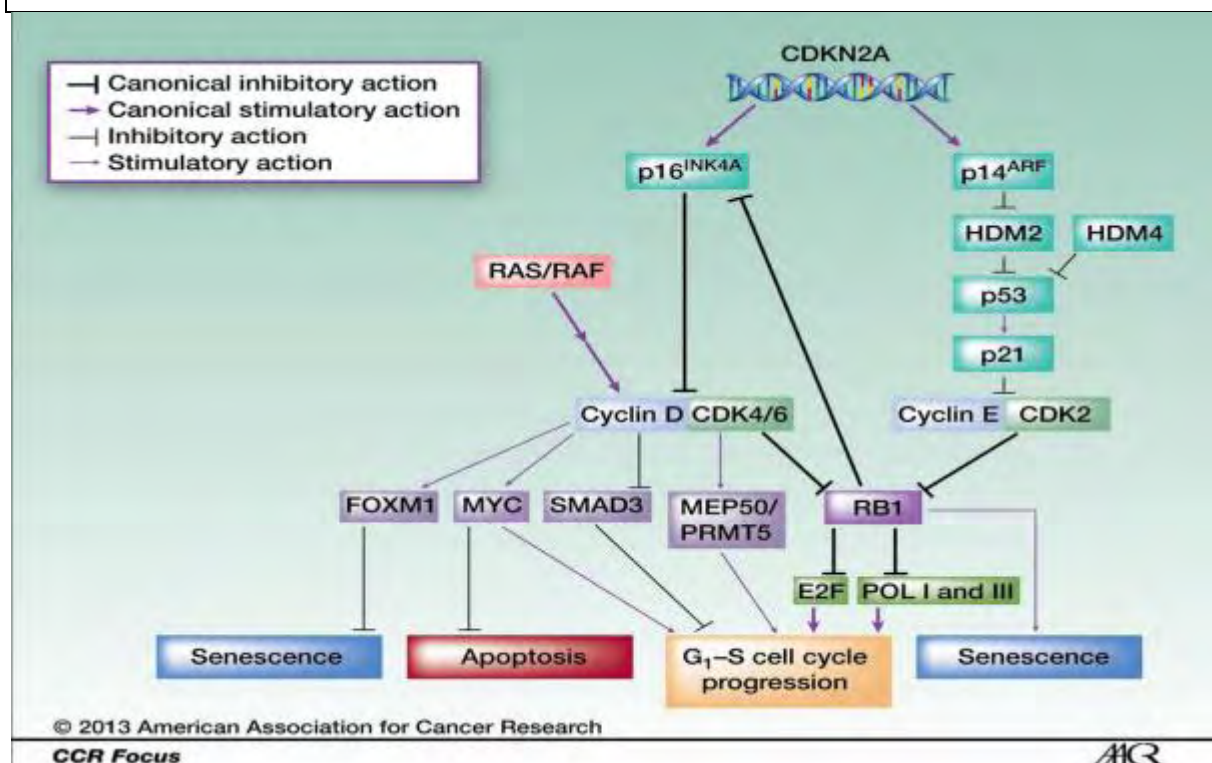
Αυτά τα μονοπάτια βοηθούν στον έλεγχο της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου και η απενεργοποίησή τους συνδέεται με μεταλλάξεις στο CDKN2A. {7}, {39}, {40}, {41}

Ο INK4A (p16INK4A) είναι ένας εξαρτώμενος από την κυκλίνη αναστολέας κινάσης, που ενεργοποιεί το γονίδιο που αποσιωπά το ρετινοβλάστωμα (RB) μέσω αρνητικής ρύθμισης του CDK4/6. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη αυτή οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα αναστολής του συμπλόκου κυκλίνης D1- CDK4, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S. 25-40% του οικογενούς μελανώματος έχουν μεταλλάξεις στην περιοχή που κωδικοποιεί το INK4A. {19}, {36}

Επιπλέον, το μεταλλαγμένο p16, ενεργοποιημένο από την απώλεια του CDKN2A οδηγεί με τη σειρά του σε υπερέκφραση της κυκλίνης D1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, η υπερέκφρασμένη κυκλίνη D1 συμβάλλει στη θεραπευτική αντίσταση των κυττάρων του μελανώματος. {42}

Μέσω ενός εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης διαπιστώνονται μεταλλάξεις στη δεύτερη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το CDKN2A, την p14ARF, οι οποίες είναι εξαιρετικά σπάνιες κι έχουν ως αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού p53 (πρωτεασωμική αποδόμηση). Έτσι συσσωρεύονται βλάβες στο DNA, τις οποίες αδυνατεί να διορθώσει το μη λειτουργικό p53, συνεπώς δεν αποκρίνεται το κύτταρο σε αυτές. {19}, {36}, {39}, {41}

ΕΙΚΟΝΑ 12. CDKN2A & ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ



2.1.8 CDK4

Η CDK4 (cyclin- dependent kinase 4) είναι ένα γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας για το κακόηθες μελάνωμα, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q14. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, αν και είναι εξαιρετικά σπάνιες. Παρατηρούνται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (Arg 24), όπου καταργούνται οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις με το p16^{INK4a}. Μετάλλαξη στο p16^{INK4a} (CDKN2A) οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αναστολής του συμπλέγματος κυκλίνης D1- CDK4, επιτρέποντας έτσι την ανεξέλεγκτη εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλίνη D1 αλληλεπιδρά με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες με αποτέλεσμα την είσοδο του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. {36}, {43}, {44}, {45}

2.1.9 CCND1

Μεταλλάξεις σε γονίδια σχετιζόμενα με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου έχουν περιγραφεί. Ενίσχυση του CCND1 αναφέρεται σε μελανώματα, ιδιαίτερα στον υπότυπο των άκρων που το ποσοστό αγγίζει το 45%. Υπερέκφραση της κυκλίνης D1, της πρωτεΐνης η οποία ελέγχεται από το CCND1, παρατηρείται όταν ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF-MAPK είτε από μετάλλαξη στο BRAF είτε στο NRAS. {36}, {45}

2.1.10 MC1R

Το γονίδιο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της μελανίνης, MC1R (melanocortin 1 receptor), αποτελεί γονίδιο μέτριας προς υψηλή διεισδυτικότητα για το κακόηθες μελάνωμα. Ρυθμίζει την απουσία ευμελανίνης ή τη συσσώρευση της καρκινογόνου φαιομελανίνης, ρυθμίζοντας παράλληλα το χρώμα του δέρματος και των μαλλιών καθώς και την αντίδραση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Αποτελεί έναν υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας συζευγμένο με πρωτεΐνη Gs, που ενεργοποιείται από τους ανταγωνιστές του, α- melanocortin (α-MSH) και ACTH. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη και οξειδωτική απόκριση. Η μετάλλαξη στο MC1R φαίνεται πως αυξάνει τον κίνδυνο για κακόηθες μελάνωμα δευτεροπαθώς, μέσω της απουσίας της ευμελανίνης και της φωτοπροστασίας που αυτή παρέχει στον οργανισμό, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών DNA λόγω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία. {36}, {46}

Ρυθμίζει την μετανάστευση των μελανοκυττάρων και των κυττάρων του μελανώματος. Αναστέλλει την ενεργοποίηση του p38, με αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση της syndecan-2, με

επακόλουθη αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης. Παραλλαγές του αυξάνουν σημαντικά τη διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων του CDKN2A στο οικογενές μελάνωμα. {46}, {47}

2.1.11 BAP1

Το BAP1 (Breast cancer 1- BRCA1 associated protein 1) είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο με μέτρια προς υψηλή διεισδυτικότητα για το κακόηθες μελάνωμα.

Μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο BAP1 ενισχύουν τη μεταστατική ικανότητα του ραγοειδούς μελανώματος και προδιαθέτουν σε οφθαλμικό και δερματικό κακόηθες μελάνωμα, άτυπους μελανοκυτταρικούς όγκους, μεσοθηλίωμα, καθώς και άλλες κακοήθειες. Τελευταία δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα πως μεταλλάξεις στο BAP1 προδιαθέτουν στην εμφάνιση ενός καρκινικού “συνδρόμου” που περιλαμβάνει τους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου – COMMON syndrome. {7}, {36}, {41}

Στη βιβλιογραφία υπάρχει συσχέτιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο BAP1 με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα. {36}

2.1.12 ACD & TERF2IP

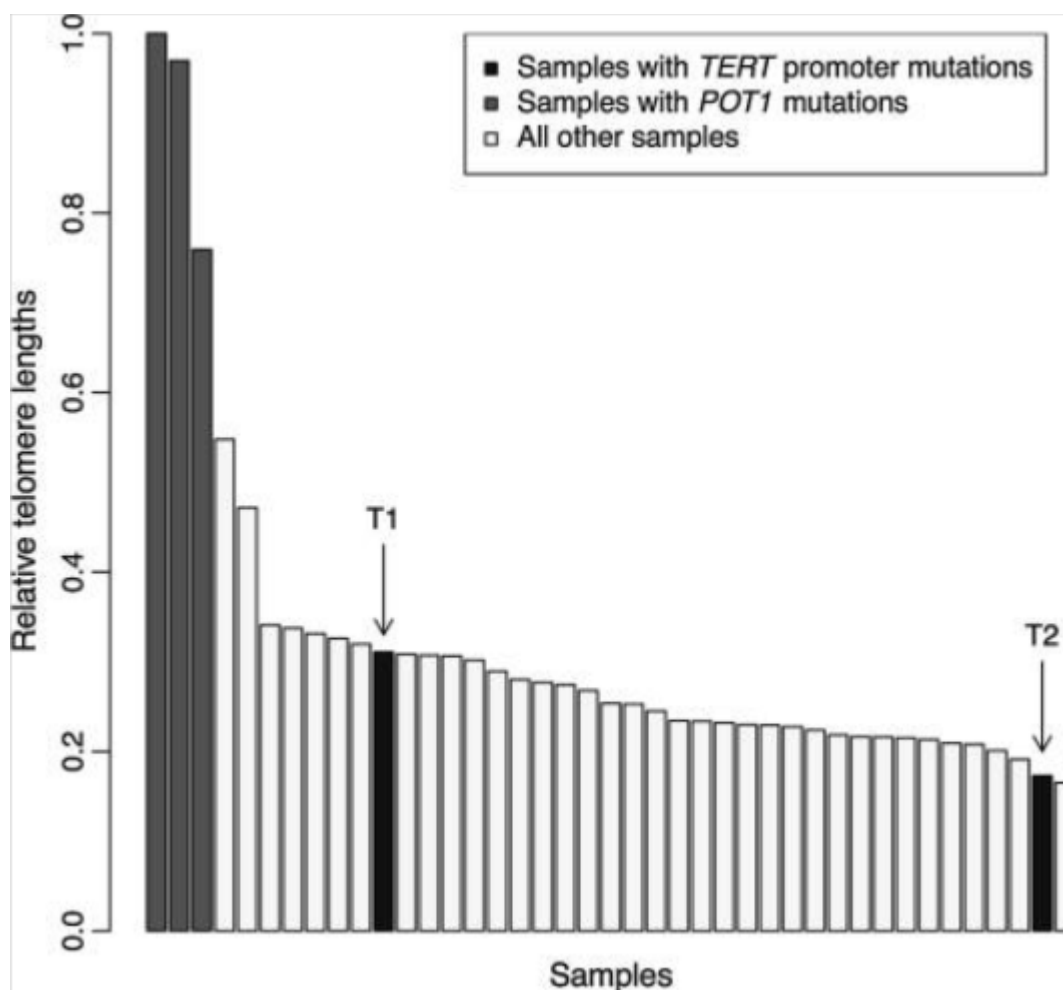
Τα γονίδια ACD (adrenocortical dysplasia homologue) και TERF2IP (Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein) έχουν συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθους μελανώματος λόγω της εμπλοκής τους στη διατήρηση της ακεραιότητας των τελομερών. {7}, {36}

2.1.13 POT1

Το γονίδιο POT1 (protection of telomeres 1) είναι ένα γονίδιο μέτριας - υψηλής διεισδυτικότητας, παραλλαγές του οποίου (variants in the protection of telomeres 1 gene) συνδέονται με το κακόηθες οικογενές μελάνωμα. {48} Το μελάνωμα συνυπάρχει με μη λειτουργικές παραλλαγές του γονιδίου POT1. Αυτές οι παραλλαγές είτε επηρεάζουν το μάτισμα του RNA ή αλλάζουν τα σημαντικά υπολείμματα της καλά συντηρημένης ολιγονουκλεοτιδικής/ ολιγοσακχαριδικής περιοχής του POT1 , εμποδίζοντας τη δέσμευση πρωτεΐνης - τελομερούς, οδηγώντας έτσι σε αύξηση του μήκους των τελομερών. Έτσι οι παραλλαγές στο POT1 προδιαθέτουν σε οικογενές μελάνωμα μέσω απευθείας δράσης στα τελομερή. {48}, {49}

2.1.14 TERT

Το γονίδιο TERT (telomerase reverse transcriptase) κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης. Μεταλλάξεις του ενισχυτή του TERT είναι σπάνιες, ωστόσο συσχετίζονται με υψηλής διεισδυτικότητας και πρώιμης έναρξης κακόηθες μελάνωμα, επεξηγώντας το <1% των περιπτώσεων του οικογενούς μελανώματος στο Ηνωμένο Βασίλειο.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. TERT & POT1: ΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ {49}

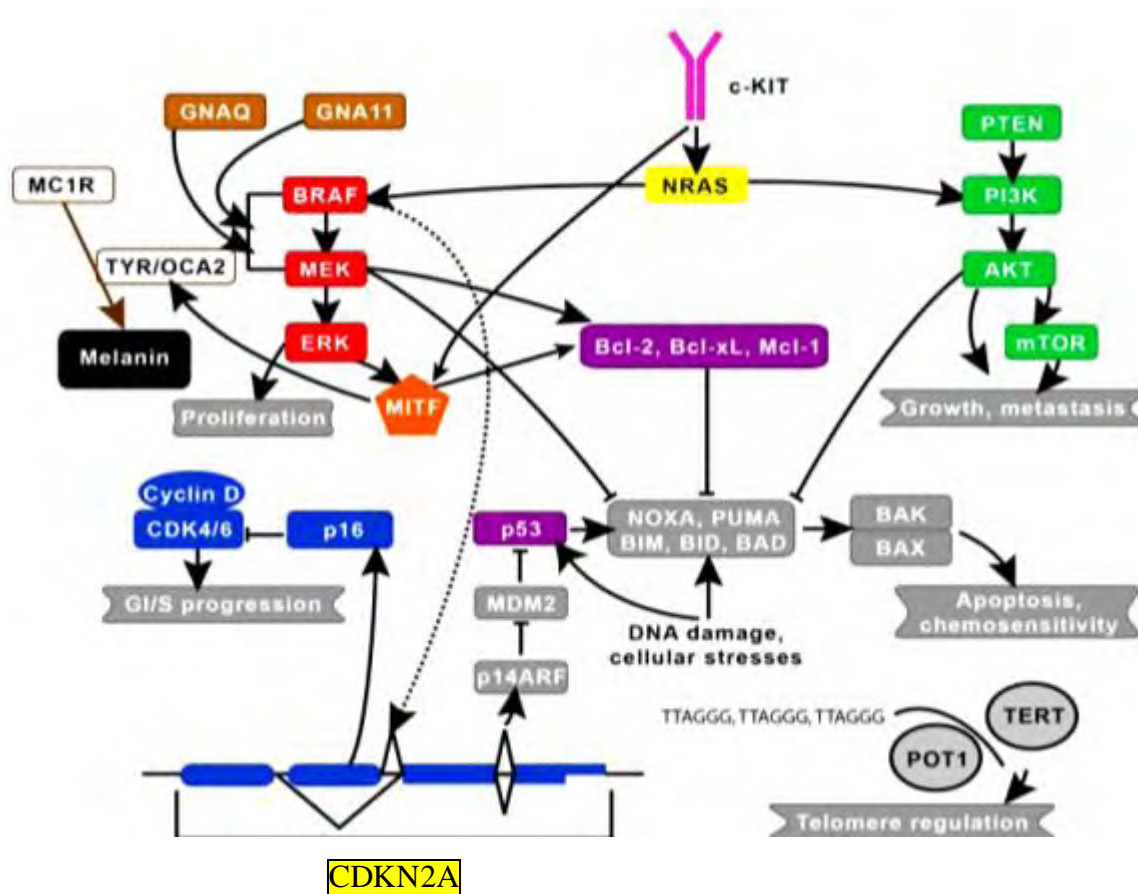
- Στο Διάγραμμα 1 παρατηρείται το υπολογιζόμενο μήκος των τελομερών σε περιπτώσεις οικογενούς μελανώματος σε σύγκριση με άλλα δείγματα.
- Πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων από Whole Exome Sequencing

Έχει εντοπιστεί συσχέτιση ενός ποικιλόμορφου του TERT (c.-57 T>G) με υψηλή διεισδυτικότητα, πρώιμη έναρξη μελανώματος καθώς και άλλων οικογενών καρκινωμάτων. Η

μετάλλαξη δημιουργεί ένα νέο μοτίβο σύνδεσης για τους Ets μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και τους παράγοντες τριμερούς συμπλόκου (TFCs) κοντά στην έναρξη της μεταγραφής. Το γονίδιο TERT έχει δράση απευθείας στα τελομερή. {8}, {49}, {50}

Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων σε POT1 & TERT υπερτονίζει τη σημασία της ακεραιότητας των τελομερών στη βιολογία του μελανώματος (Διάγραμμα 1). {14}

ΕΙΚΟΝΑ 13. ΣΥΝΟΨΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΠΟΒΑΘΡΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ {51}



3. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

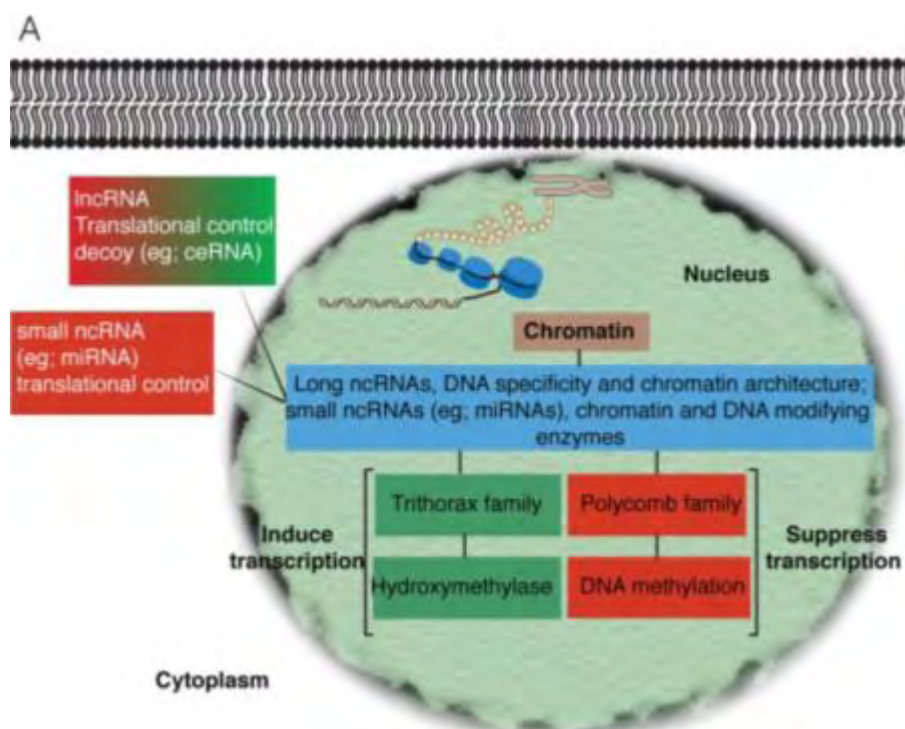
Επιγενετική είναι η μελέτη των αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων, που εμφανίζονται χωρίς κάποια αλλαγή στην αλληλουχία του πυρηνικού DNA. Είναι η διαδικασία της επίδρασης στη δράση ενός γονιδίου χωρίς να αλλάζει το ίδιο το DNA του γονιδίου. Το επιγένωμα είναι η γενική επιγενετική κατάσταση ενός κυττάρου. Δεδομένου ότι ένα έμβρυο μπορεί να παραγάγει ένα πλήθος κυττάρων με διαφορετικές τύχες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ένα γονιδίωμα δίνει γένεση σε πολλά επιγενώματα. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επιτρέπουν στα κύτταρα να χρησιμοποιούν από τη γενετική πληροφορία μόνο αυτή που κάθε φορά χρειάζεται. Αν και κάθε κύτταρο διαθέτει ολόκληρη τη γενετική πληροφορία για τη δημιουργία του οργανισμού, δεν χρησιμοποιεί παρά μόνο ένα μέρος της. {9}, {52}, {53}

Στα φυσιολογικά κύτταρα, οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί, η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα miRNAs, μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων τροποποιώντας την πρόσβαση στους υποκινητές γονιδίων και στις ρυθμιστικές περιοχές. Αυτή η εύρυθμη λειτουργία χάνεται κατά την καρκινογένεση. Διαταραχή της επιγενετικού μηχανισμού ελέγχου της γονιαδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Μέσα από τις αλλαγές στη δομή της χρωματίνης μέσω τροποποιήσεων στις βάσεις του DNA και στις ιστόνες και τη ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA μέσω των μη κωδικών μορίων RNA, το επιγένωμα αποφασίζει ποια γονίδια θα εκφραστούν και ποια όχι. Οι περισσότερες από τις επιγενετικές αλλαγές είναι αναστρέψιμες και επομένως οι επιγενετικοί δείκτες είναι ιδανικοί για την ανάπτυξη νέων προληπτικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων. {54} Η αποκωδικοποίηση και η κατανόηση των επιγενετικών μηχανισμών εκτός από το να αποσαφηνίσει τους αιτιολογικούς και παθογενετικούς μηχανισμούς πολύπλοκων νοσημάτων, δύναται να προσφέρει νέες, υψηλότερου θεραπευτικού δυναμικού θεραπείες, με λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με τη μέχρι σήμερα αγωγή. {9}, {55}, {56}

Τα τελευταία χρόνια ο καθοριστικός ρόλος της απορρύθμισης επιγενετικών μηχανισμών στη παθογένεια του μελανώματος, βρίσκεται στο επίκεντρο εντατικής έρευνας. Πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν τη σύνθετη συμμετοχή επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μέσω μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA, τροποποίησης δομής Χρωματίνης και αναδιαμόρφωσης της αρχιτεκτονικής της (επηρεάζουν τη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων- κλειδιών στο μελάνωμα), ποικίλων δράσεων non-coding RNAs (long ncRNAs & small ncRNAs- miRNAs), επιρροής στη λειτουργία των

σηματοδοτικών μονοπατιών που αλληλοεπηρεάζονται και διατέμνονται με τέτοιο τρόπο που οι διαταραχές μπορεί να επηρεάσουν το σύνολο της έκφρασης γονιδίων. {9}, {52}

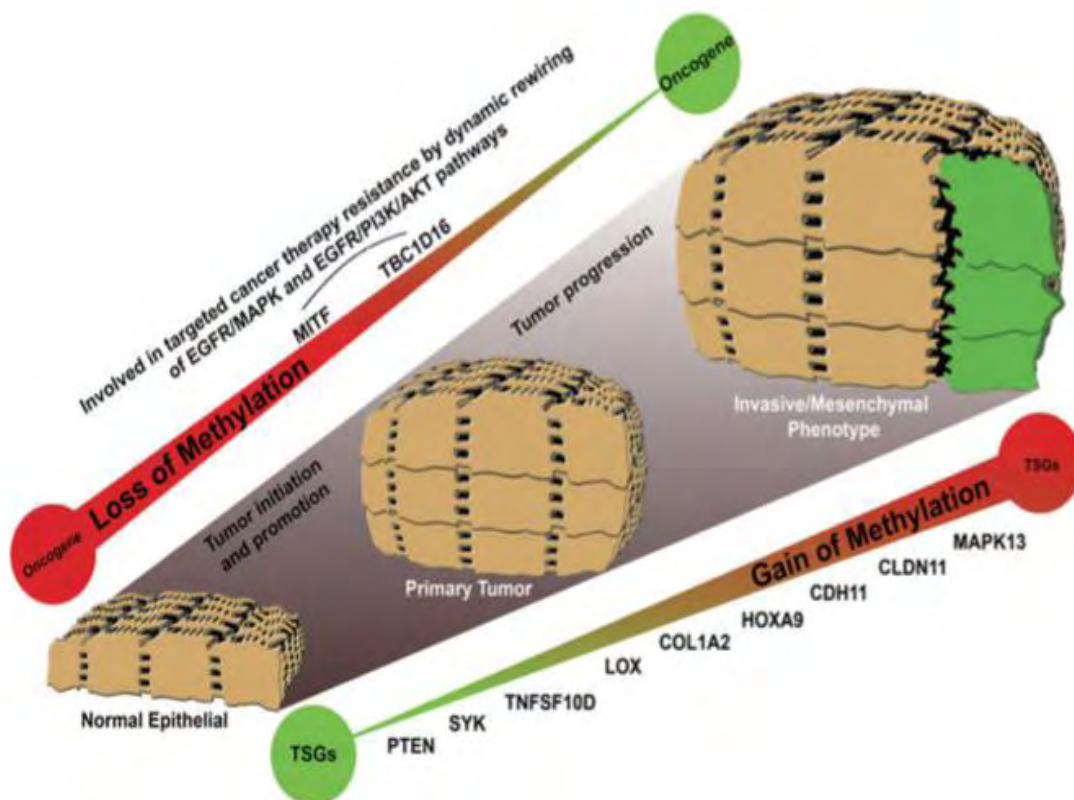
Έχουν βρεθεί επιγενετικοί ρυθμιστές με καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση του μελανώματος. Οι τροποποιήσεις της χρωματίνης είναι αναπόσπαστο κομμάτι της γονιδιακής ρύθμισης στο επίπεδο της μεταγραφής και καθοδηγούνται από long ncRNAs, δρώντας ως ειδικές αναγνωριστικές αλληλουχίες ή ικρίωματα. Η οικογένεια PRC (polycomb family) αποσιωπεί τη μεταγραφή μέσω της μεθυλίωσης του DNA και η οικογένεια trithorax επάγει τη μεταγραφή μέσω της υδροξυμεθυλάσης (επάγοντας ή αποσιωπώντας την έκφραση γονιδίων). Ένζυμα που τροποποιούν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης ρυθμίζονται από miRNAs. Η μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA δύνανται να τροποποιήσουν τη δομή του DNA αργότερα. Έχει τεκμηριωθεί ότι η απώλεια της επιλεκτικής απομεθυλίωσης του DNA στα μελανοκύτταρα της επιδερμίδας οδηγεί στην εμφάνιση κυττάρων μελανώματος. Στο κυτταρόπλασμα, τα long ncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων, δρώντας ως δολώματα (έλεγχος της μετάφρασης) ή μέσω αδιευκρίνιστων μηχανισμών συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης των ριβοσωμάτων. Τα miRNAs δρούν ως βασικά ρυθμιστικά μόρια στο κυτταρόπλασμα (έλεγχος της μετάφρασης). {9}, {52}, {57}



ΕΙΚΟΝΑ 14. ΔΙΚΤΥΑ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ {52}

Παρατηρούνται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ελέγχουν την έκφραση γονιδίων επάγοντας ή καταστέλλοντας την μεταγραφή (πχ μεθυλίωση του DNA). Ελέγχουν την μετάφραση μέσω miRNAs. Η ογκοκατασταλτική δράση των miRNAs φαίνεται να διαμεσολαβείται μεταξύ άλλων και από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Polycomb, ενώ η ογκογόνος δράση από τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος Trithorax (TrxG).

Η εξέλιξη της επιγενετικής ειδικά τα τελευταία χρόνια αποκάλυψε νέες προοπτικές κατανόησης, πρόγνωσης καθώς και αντιμετώπισης του μελανώματος, παρέχοντας έναν ικανοποιητικό αριθμό βιοδεικτών, που βασίζονται στη μεθυλίωση του ή απομεθυλίωση του DNA. Όλα αυτά τα ευρήματα δημιουργούν την προσδοκία μέσα στα επόμενα χρόνια να έχουμε μια εξατομικευμένη αντιμετώπιση του μελανώματος σε κάθε ασθενή, γνωρίζοντας πλήρως το υπόβαθρο της νόσου του. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μεθυλίωση ογκοκατασταλτικών (60-80% στο μελάνωμα) και η απομεθυλίωση ογκογονιδίων (eg MITF & TBC1D16), που παίζουν ρόλο στόχου στην φαρμακοαντοχή (μέσω της δυναμικής επανένωσης των μονοπατιών EGFR/ MAPK & EGFR/ PI3K/ AKT) είναι υψηλής κλινικής σημασίας για το κακόηθες μελάνωμα. {9}, {57}



EIKONA 15. Η εξέλιξη του μελανώματος από την οπτική γωνία της Επιγενετικής {9}

3.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

Έχει βρεθεί ικανοποιητικός αριθμός βιοδεικτών, που βασίζονται στη μεθυλίωση ή απομεθυλίωση του DNA. Αρχικές μελέτες έδειξαν επιγενετικές αλλαγές σε περιοχές του υποκινητή, πλούσιες σε CpG (υπερμεθυλίωση). Επιγενετική απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (πχ μεθυλίωση PTEN 60%, TNFSF10D 80%, COL1A2 80% & LOX 50%) έχει ενοχοποιηθεί στην έναρξη, αλλά και πρόοδο του μελανώματος. Η διενέργεια μελετών στο σύνολο του επιγονιδιώματος έδειξε υπομεθυλίωση σε διαγονιδιακές περιοχές, περιοχές γονιδίων αλλά και περιοχές απομακρυσμένες από τα νησίδα CpG. {58}, {59}

Έχει τεκμηριωθεί ότι η απώλεια της επιλεκτικής απομεθυλίωσης του DNA στα μελανοκύτταρα της επιδερμίδας οδηγεί στην εμφάνιση κυττάρων μελανώματος, ορισμένα από τα οποία στην πορεία αποκτούν χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων. {54} Η απομεθυλάση των ιστονών JARID1B, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς εκφράζεται σε ένα κυτταρικό υποπληθυσμό του μελανώματος ο οποίος φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη του όγκου και χαρακτηρίζεται από ιδιότητες βλαστικών κυττάρων in vitro. Η απώλεια επίσης του JARID1B οδήγησε σε εξάλειψη των κυττάρων του όγκου in vitro και in vivo. {9}, {57}, {60}

Ένας αυξημένος όγκος δεδομένων υποστηρίζει ότι ο EZH2 (πρωτεΐνη της οικογένειας Polycomb), μια μεθυλοτρανσφεράση που καταλύει την επιγενετική τροποποίηση H3K27me3 έχει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια του μελανώματος. Τα αποτελέσματα των ερευνών υποδεικνύουν μια ενεργοποίηση του EZH2 παράλληλα με την κακοήγη εξαλλαγή του μελανοκυττάρου. {61}, {62}, {63}

Αντίθετα ο MLL (πρωτεΐνη του συμπλέγματος Trithorax), καταλύει την επιγενετική τροποποίηση H3K4me3, η οποία σχετίζεται με ενεργή κατάσταση της χρωματίνης. Επιπλέον, οι EZH2 και MLL στρατολογούν και διασυνδέονται και με άλλα ένζυμα τροποποίησης ιστονών, τα οποία εμφανίζουν εξίσου «αντιμαχόμενη» δράση. Έτσι, ο EZH2 στρατολογεί αποακετυλάσες (HDACs) και απομεθυλάσες (HDMs) των ιστονών που έχουν σαν αποτέλεσμα τη γονιδιακή αποσιώπηση. Αντίθετα, ο MLL στρατολογεί ακετυλάσες (HATs) και απομεθυλάσες (HDMs) των ιστονών που οδηγούν σε ενεργή κατάσταση της χρωματίνης. Η τελική συνισταμένη των δράσεων του συνόλου των ενζύμων τροποποίησης των ιστονών οδηγεί σε μια λεπτή ισορροπία και έναν περίτεχνο μηχανισμό ελέγχου γονιδιακής έκφρασης. Η απορρύθμιση αυτού του περίτεχνου επιγενετικού μηχανισμού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Για παράδειγμα, η γονιδιακή αποσιώπηση,

μέσω της δράσης του EZH2 και πιθανόν της αυξημένης παρουσίας bivalent domains στους υποκινητές ογκοκαταλκικών γονιδίων, όπως το γονίδιο miR-200c, δύναται να οδηγήσει σε ανάπτυξη μελανώματος. {9}, {57}, {64}

Αξιοσημείωτα, σε πολλούς συμπαγείς όγκους έχει βρεθεί απορρύθμιση και απώλεια λειτουργίας λόγω μεταλλάξεων της απομεθυλάσης KDM6A. Αυτό υποδεικνύει, ότι αυξημένα επίπεδα H3K27me3 ενέχονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης, ενώ σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση σε ορισμένα νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος. {9}, {57}

Σύμφωνα με μελέτη σύγκρισης επιγονιδιωμάτων (Guo et al.) σε ασθενείς με οικογενές μελάνωμα με μετάλλαξη BRAFV600E βρέθηκε υπομεθυλίωση στις περιοχές CpG σε ποσοστό 98% & υπερμεθυλίωση σε ποσοστό 2%. {9}, {57}, {64}

Επίσης έχει εντοπιστεί σύνδεση μετάλλαξης BRAFV600E με ‘‘ολοκληρωτική’’ υπομεθυλίωση και μειωμένη έκφραση DNMT3A, μιας de novo μεθυλτρανσφερασης των κυττάρων με αποτέλεσμα επανενεργοποίηση του MITF ογκογονιδίου (upregulation) και επαγωγή νέων μονοπατιών με αποτελέσματα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. {65}, {66}

Η επιγενετική ενεργοποίηση μιας αιτιοπαθολογικής παραλλαγής του γονιδίου TBC1D16 ενισχύει την εξέλιξη του μελανώματος, μέσω της επιγενετικής ρύθμισης του EGFR. {9}, {57}, {64}, {65}

Επιγενετικές αλλαγές του EGFR (upregulation- απομεθυλίωση, επαγωγή- επανενεργοποίηση μονοπατιών MAPK & PI3K/AKT) παίζουν σημαντικό ρόλο στο μελάνωμα που είναι ανθεκτικό στους αναστολείς BRAF. {64}, {65}

3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Οι πολυμορφισμοί των ιστονών αποτελούν πολύ σημαντικά στοιχεία επιγενετικής που επηρεάζουν την γένεση αλλά και την ανάπτυξη- εξέλιξη του μελανώματος. Ειδικότερα, η ενσωμάτωση των παραλλαγών των ιστονών ενεργοποιεί επιπλέον στρώματα στη δομή της χρωματίνης. Οι αλλαγές στη συγκεκριμένη επιγενετική συμπεριφορά έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο μελάνωμα. {52}, {67}, {68}

Ο πολυμορφισμός της ιστόνης H2A, MacroH2A (transcriptional repression- regulation of CDK8 and cell cycle- related genes) έχουν υψηλή συσχέτιση με το μελάνωμα. Η υπερέκφραση της macroH2A κατέστειλε την εξέλιξη των κυττάρων του μελανώματος και

σταμάτησε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης των cyclin D1, cyclin D2, CDK6 και CDK8. Η macroH2A1.1 ίσως ανταγωνίζεται την εξέλιξη του μελανώματος μέσω του ελέγχου της ενζυμικής δραστηριότητας του PARP-1 (ένζυμο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA). {9}, {52}, {57}

Ο πολυμορφισμός ιστόνης H2A, H2A.Z εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με το μελάνωμα. Η H2A.Z-2, αλλά όχι η H2A.Z-1 ενοχοποιείται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ευαισθησία σε φαρμακευτική αγωγή στο κακόηθες μελάνωμα. {52}, {68}

Η ιστόνη H3.3, η οποία έχει ενοχοποιηθεί στην καρκινογένεση, φαίνεται πως έχει διακριτό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη του μελανώματος (διερευνάται ο μηχανισμός).

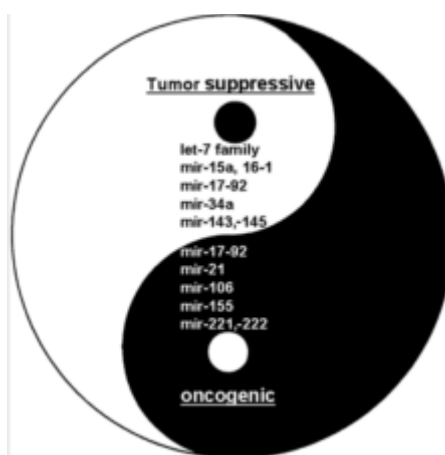
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΥΛΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ {61}

Histone methyltransferase	Histone modification	Transcriptional activation or repression	Consequence
CARM1/PRMT6	H3R2	Repression	Downregulated in melanoma leading to activation of ERK signaling (Limm et al., 2013)
PRMT5	H3R8	Repression	Overexpressed in melanoma, regulates MITF and p27 (Nicholas et al., 2013)
SETDB1	H3K9	Repression	Identified within the melanoma susceptibility locus 1q21.3 as recurrently amplified (MacGregor et al., 2011)
RIZ1	H3K9	H3K9	Frameshift mutations identified in melanoma (Poetsch et al., 2002). Activating mutations identified within the catalytic SET domain (Hodis et al., 2012), (Krauthammer et al., 2012), (Alexandrov et al., 2013)
NSD1	H4K20	Repression	Overexpressed in metastatic melanoma (de Souza et al., 2012)

3.3 ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

3.3.1. ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (MiRNAs)

Ενώ όλα τα miRNAs δρουν ως αρνητικοί μεταμεταγραφικοί ρυθμιστές, η ανώμαλη λειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε αντίθετο παθοφυσιολογικό αποτέλεσμα σε σχέση με το mRNA – στόχο. Έτσι τα MiRNAs μπορεί να έχουν είτε ογκογόνο είτε ογκοκατασταλτική δράση. {69}, {70}, {71}, {72}



ΕΙΚΟΝΑ 16. Αντιπροσωπευτικά miRs με ογκογόνα ή ογκοκατασταλτική δράση {73}

Φυσιολογικά τα MiRNAs ελέγχουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση των γονιδίων, ρυθμίζοντας πολλαπλά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην έναρξη και την πρόοδο διαφόρων καρκινικών τύπων, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος. Προκαλούν μεταφραστική καταστολή. {69}, {70}, {71}, {72}

Έχουν καθοριστικό ρόλο σε πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες, καθώς και στη βιολογία των μελανοκυττάρων και του μελανώματος, στην ανοσολογική απάντηση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην κυτταρική μετανάστευση και εισβολή, στην απόπτωση και στους επιγενετικούς μηχανισμούς, ρυθμίζοντας τα γονίδια- στόχους (ογκοκατασταλτικά και ογκογονίδια). {69}

Με τη χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) και NGS παρατηρήθηκε συμμετοχή ανωμαλιών miRNA σχεδόν σε όλους τους καρκίνους (συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος). {69}

Τα microRNAs αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες για την πρόγνωση και διάγνωση του μελανώματος, ενώ συμβάλλουν και στη θεραπευτική του προσέγγιση, ενώ και στο μέλλον αναμένεται να παίξουν καθοριστικό ρόλο στην πρόγνωση και διάγνωση του πολύπλευρου αυτού τύπου καρκίνου. {69}, {71}, {72}, {74}

Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA αναφορικά με το κακόηθες μελάνωμα εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη μετανάστευση των κυττάρων, στην απόπτωση, στην επιγενετική και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του κυττάρου. {70}, {72}

Η υποξία ενισχύει την έκφραση πολλών miRNAs. Επηρεάζει το μικροπεριβάλλον, ευνοεί την αποφυγή της ανοσολογικής απάντησης διευκολύνοντας έτσι την δημιουργία και

εξάπλωση του μελανώματος μέσω κυρίως downregulation των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ανοσολογική απάντηση. {70}, {72}

Ακολουθούν πίνακες που απεικονίζουν τους ρόλους που υποδύονται τα miRNAs στο μελάνωμα, καθώς και τον γονιδίων – στόχων που αυτά έχουν:

Name of miRNA	Expression of miRNAs
<i>let-7b</i>	Down
<i>miR-193b</i>	Down
<i>miR-145</i>	Down
<i>miR-206</i>	Down
<i>miR-221/222</i>	Up
<i>miR-205</i>	Down
<i>miR-34a/c</i>	Down
<i>miR-9</i>	Down
<i>miR-21</i>	Up
<i>miR-203</i>	Down
<i>miR-195</i>	Down
<i>miR-786-3p</i>	
<i>miR-214</i>	
<i>miR-15b</i>	
<i>miR-126</i>	Down
<i>miR-18b</i>	
<i>miR-149</i>	

ΠΙΝΑΚΑΣ 5



ΕΙΚΟΝΑ 17

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. – ΕΙΚΟΝΑ 17. MiRNAs που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον κυτταρικό κύκλο {70}

	Name of miRNA	Expression of miRNAs
	<i>miR-155</i>	
miRNAs involved in invasion	<i>miR-145</i>	Down
	<i>let-7a</i>	Down
	<i>let-7b</i>	Down
	<i>miR-200 family</i>	Down
	<i>miR-34a/b/c</i>	Down
	<i>miR-199</i>	Down
	<i>miR-9</i>	Down
	<i>miR-182</i>	Up
	<i>miR-30b/d</i>	Up
	<i>miR-375</i>	Down
	<i>miR-211</i>	Down
	<i>miR-214</i>	Up
	<i>miR-137</i>	
	<i>miR-148</i>	
	<i>miR-182</i>	
miRNAs involved in apoptosis	<i>miR-15b</i>	Up
	<i>miR-155</i>	Down
	<i>miR-211</i>	
	<i>miR-26a</i>	Down
	<i>miR-768-3p</i>	
	<i>miR-21</i>	
miRNAs involved in epigenetics	<i>Global effect</i>	
	<i>miR-375</i>	
	<i>miR-34b</i>	

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

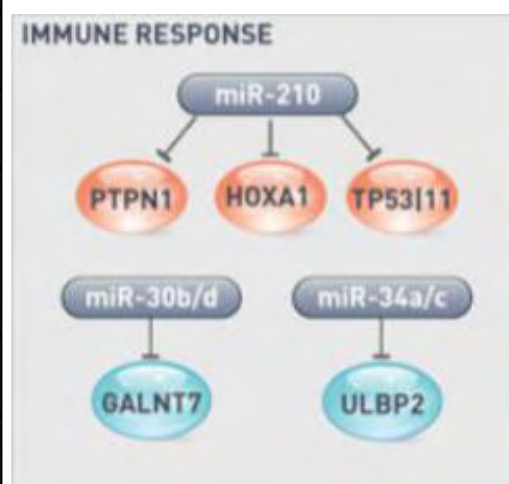


ΕΙΚΟΝΑ 18

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 – ΕΙΚΟΝΑ 18. MiRNAs εμπλεκόμενα στην εισβολή, απόπτωση και επιγενετική {70}

Name of miRNA	Expression of miRNAs
<i>miR-182</i>	
<i>miR-34a</i>	
<i>miR-137</i>	
<i>miR-29c</i>	
<i>miR-31</i>	
<i>miR-18b</i>	
<i>miR-210</i>	
<i>miR-34a/c</i>	Down
<i>miR-30b/d</i>	Up

ΠΙΝΑΚΑΣ 7



ΕΙΚΟΝΑ 19

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 – ΕΙΚΟΝΑ 19. MiRNAs εμπλεκόμενα στην ανοσολογική απάντηση {70}

3.3.2 ΜΑΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (lncRNAs)

Το εύρος του μεγέθους των lncRNA ποικίλλει (200 έως δεκάδες χιλιάδες νουκλεοτίδια) και τουλάχιστον 10 φορές μακρύτερα σε σχέση με τα miRs (μερικές φορές έως και χιλιάδες μακρύτερα). Ρυθμίζονται κυρίως από την RNA πολυμεράση II.

Σε μελέτη των Khaitan et al (2011) ταυτοποιήθηκαν 77 lncRNA, τα οποία απορρυθμίζονται στις κυτταρικές σειρές του μελανώματος, ένα εκ των οποίων είναι το

SPRY4-IT1 (upregulation στο μελάνωμα). Μέσω FISH ανάλυσης του RNA, διαπιστώθηκε εντόπιση του SPRY4- IT1 στο κυττρόπλασμα των μελανοκυττάρων και η απενεργοποίηση του οδηγεί σε ελλείματα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά απόπτωσης των μελανοκυττάρων. {75}

Η απορρύθμιση των lncRNAs παίζει σημαντικό ρόλο στη γένεση- έναρξη του μελανώματος, επηρεάζει τη δυναμική των κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων, της διαφοροποίησης των, καθώς και υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές του μελανώματος. {52}, {76}

Σε μελέτη των Schmidt et al (2016) επισημάνθηκε ο ρόλος της υπερέκφρασης του SLNCR1 στην αύξηση της διεισδυτικότητας του μελανώματος. Το SLNCR1 είναι απαραίτητο για τη μεταφραστική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MMP9 (matrix metalloproteinase 9). Η υπερέκφραση του SLNCR1 συνδέεται με κακή πρόγνωση και υψηλής κακότητας συμπεριφορά του μελανώματος και συνεπώς χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης, μέσω και της συνέργειας του lncRNA SRA1. {77}, {78}

Το ANRIL (long ncRNA) ως μεταγραφικός στόχος του ογκογονικού υποδοχέα που σηματοδοτεί το μονοπάτι MAPK (tyrosine kinase- NRAS- BRAF). Εμπλέκεται στη ρύθμιση έκφρασης του CDKN2A/B, επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη γήρανση. Μπορεί να προσλάβει το PRC2 & PCR1, μειώνοντας την έκφραση των ογκοκατασταλτικών miR-449a & miR-99a. {52}, {76}, {78}, {79}

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Μακρά μη κωδικά μόρια RNA (lncRNA) και ο ρόλος τους στο μελάνωμα {78}

Name	Cell utilized	Expression	Type of lncRNA	Role of lncRNA
<i>SPRY4-IT1</i>	WM1552C	Upregulated	Antisense long non-coding RNA	Regulation of cells viability apoptosis and melanoma cell motility
<i>BANCR</i>		Upregulated	lncRNA	Migratory capacity of melanoma cells by regulating CXCL1
<i>HOTAIR</i>			lncRNA	Motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma
<i>LIME23</i>	YUSAC melanoma cell line	Upregulated	lncRNA	Regulate process of melanoma through binding of PSF
<i>TUG1</i>			lncRNA	---
<i>ANRIL</i>	Human blood cells	Upregulated	Antisense long non-coding RNA	Risk of melanoma due to SNPs in 9P21 region
<i>GAS5</i>		-----	-----	Malignant melanomas due to special break points at 1p36 and at several sites throughout 1p22-q21

4.ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ- ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

4.1 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Ολόκληρη η δερματική επιφάνεια, συμπεριλαμβανομένου του τριχωτού της κεφαλής και των βλεννογόνων, πρέπει να εξετάζονται σε κάθε ασθενή. Ο φωτεινός φωτισμός δωματίου είναι σημαντικός και ένας φακός χεριού 7x έως 10x βοηθάει στην αξιολόγηση της ποικιλίας της χρωματικής κατανομής. Ένα ιστορικό παρόμοιων παραγόντων κινδύνου θα πρέπει να δηλωθεί, ενώ πρέπει να ληφθεί αναλυτικό οικογενειακό ιστορικό. Σε κάθε ύποπτη βλάβη πρέπει να γίνει βιοψία και να αξιολογηθεί από ειδικό ή να καταγραφεί σε διάγραμμα ή/και να φωτογραφηθεί για την περαιτέρω παρακολούθηση. Η εξέταση των λεμφαδένων και η ψηλάφηση των κοιλιακών οργάνων είναι μέρος της κλινικής εξέτασης σταδιοποίησης για το κακόηθες μελάνωμα. Ο ασθενής πρέπει να συμβουλευτεί να εξεταστούν και τα άλλα μέλη της οικογένειας αν υπάρχει μελάνωμα ή κλινικά άτυποι (δυσπλαστικοί) σπίλοι. Η ανεύρεση πρώιμου μελανώματος σε συγγενείς έχει αναφερθεί. {1}, {2}

4.2 ΒΙΟΨΙΑ

Κάθε έγχρωμη δερματική βλάβη που έχει αλλάξει σε μέγεθος ή σχήμα ή έχει άλλα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν κακοήθεια, είναι υποψήφια για βιοψία. Η συνιστώμενη τεχνική είναι μια βιοψία εκτομής, καθώς αυτή διευκολύνει την παθολογική εκτίμηση της βλάβης, επιτρέπει την κατάλληλη μέτρηση του πάχους, αν η βλάβη είναι κακόηθες μελάνωμα και συνιστά τη θεραπεία αν η βλάβη είναι καλοήθης. Για μεγάλες βλάβες ή βλάβες σε ανατομικές θέσεις, όπου η βιοψία εκτομής δεν είναι εφικτή, όπως το πρόσωπο, τα χέρια αι τα πόδια, μία βιοψία εντομής διενεργείται στην περισσότερο οζώδη ή σκούρα περιοχή της βλάβης. Αυτή πρέπει να περιλαμβάνει την κάθετη φάση ανάπτυξης του πρωταρχικού όγκου, εφόσον υπάρχει. Η βιοψία εντομής δε φαίνεται να διευκολύνει την εξάπλωση του μελανώματος. {1}, {80}

4.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Όταν η διάγνωση του κακοήθους μελανώματος επιβεβαιωθεί, ο όγκος πρέπει να σταδιοποιηθεί για να καθοριστεί η πρόγνωση και η θεραπεία. Το ιστορικό πρέπει να διερευνηθεί για ένδειξη μεταστατικής νόσου, όπως κακουχία, απώλεια βάρους, κεφαλαλγίες,

δυσκολία στην όραση ή οστικά άλγη. Η φυσική εξέταση πρέπει να κατευθυνθεί απευθείας στο δέρμα, στους τοπικούς παροχετευτικούς λεμφαδένες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ και στον σπλήνα. Επί απουσίας σημείων ή συμπτωμάτων μετάστασης ορισμένες εργαστηριακές και ακτινολογικές δοκιμασίες ενδείκνυνται για τη διαδικασία σταδιοποίησης. Καμία δοκιμασία ή τομογραφία δε συνίσταται ως ρουτίνα, εκτός και αν το ιστορικό ή η φυσική εξέταση δηλώνει μετάσταση σε συγκεκριμένο όργανο. Οι ασθενείς ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια. {1}, {3}, {52}

4.4 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Για ένα πρόσφατα διαγνωσμένο δερματικό μελάνωμα, η βαθιά χειρουργική εκτομή της βλάβης με ένα όριο φυσιολογικού δέρματος είναι απαραίτητη, ώστε να αφαιρεθούν όλα τα κακοήγη κύτταρα και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανή τοπική υποτροπή. Το κατάλληλο βάθος του ορίου είναι αμφιλεγόμενο. Μία δοκιμή του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, που διενεργήθηκε για όρια 1-3cm σε 612 ασθενείς με λεπτά κακοήγη μελανώματα (<2mm πάχος), ανέφερε ότι το μικρότερο όριο οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά τοπικής υποτροπής, αλλά σε καμία διαφορά στα ποσοστά λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων στην επιβίωση-ελεύθερης νόσου ή στη συνολική επιβίωση. Μία άλλη τυχαία κλινική δοκιμή που συνέκρινε τα 2 ή 4 cm χειρουργικού ορίου για βλάβες ενδιάμεσου πάχους (1-4 mm) επίσης δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές στη συνολική επιβίωση. Τα παρακάτω όρια μπορεί να συσταθούν για το πρωτοπαθές μελάνωμα: in situ: 0,5cm, διηθητικό πάνω από 1mm πάχος: 1,0cm, >1,0mm: 2,0cm. Για βλάβες στο πρόσωπο, στα χέρια και τα πόδια, η αυστηρή προσκόλληση σε αυτά τα όρια πρέπει να δώσει ώθηση στις απόψεις του ατόμου για περιορισμό του χειρουργείου και ελαχιστοποίηση της νοσηρότητας. Σε όλες τις περιπτώσεις η συμπερίληψη του υποδόριου λίπους στο χειρουργικό δείγμα διευκολύνει τη μέτρηση του επαρκούς πάχους και την αξιολόγηση του χειρουργικού ορίου από τον ιατρό. {1}, {81}

4.5 ΒΙΟΨΙΑ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ ΦΡΟΥΡΟΥ (SLNB)

Η βιοψία λεμφαδένα φρουρού έχει αντικαταστήσει την προαιρετική λεμφαδενική εκτομή για την αξιολόγηση της κατάστασης των περιφερικών λεμφαδένων. Ο αρχικός παροχετευτικός λεμφαδένας από την αρχική θέση αναγνωρίζεται μέσω έκχυσης μιας χρωστικής κυανού χρώματος και ενός ραδιοϊσοτόπου γύρω από την αρχική θέση. Ο αρχικός

παροχετευτικός λεμφαδένας αναγνωρίζεται μετά από επισκόπηση της λεμφαδενικής βάσης του λεμφαδένα που χρωματίστηκε κυανός ή / και του λεμφαδένα με την υψηλότερη πρόσληψη ραδιοϊσοτόπου. Ακολουθεί αφαίρεση τους και προσεκτική ιστοπαθολογική διαδικασία με σειριακές τομές που χρωματίζονται με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που αναδεικνύουν τα μελανοκύτταρα. Η sentinel εξέταση των λεμφαδένων είναι ένα ωφέλιμο εργαλείο σταδιοποίησης και μπορεί να αποτρέψει την ανάγκη ολοκληρωτικής λεμφαδεκτομής στην περίπτωση μιας αρνητικής βιοψίας. Οι ασθενείς με βλάβες <0,75mm σε πάχος έχουν άριστη πρόγνωση και δεν είναι υποψήφιοι για SNLB, εκτός κι αν άλλα χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου είναι παρόντα (εξελκώσεις, βιοψία με συμμετοχή βάσης κλπ). Στο άλλο άκρο ασθενείς με βλάβες >4mm έχουν τόσο μεγάλο κίνδυνο για απομακρυσμένες μεταστάσεις, που ο έλεγχος λεμφαδενικής νόσου μπορεί να μη διαφοροποιήσει την τελική κλινική έκβαση. Αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη, ενώ είναι χρήσιμη στην επιλογή των ασθενών που μπορεί να ωφεληθούν από βοηθητική θεραπεία. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (κλινικές δοκιμές σε περισσότερους από 2000 ασθενείς με μελάνωμα) και οδηγίες από τις Society of Surgical Oncology και American Society of Clinical Oncology συνίσταται απόλυτα η χρήση της sentinel βιοψίας λεμφαδένα σε όγκους μέτριου πάχους και σε πρωτοπαθείς όγκους αυξημένου πάχους, καθώς παρέχει ακριβείς και σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τη σταδιοποίηση, ενώ παράλληλα βελτιώνουν σημαντικά την τοπική αντιμετώπιση του μελανώματος. Βελτιώνει αισθητά την επιβίωση των ασθενών με τοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις, επηρεάζοντας σημαντικά τη δεκαετή επιβίωση τους. {1}, {81}, {82}, {83}

4.6 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Υπάρχει θέση για την ακτινοθεραπεία στην αντιμετώπιση του τύπου της κακοήθους φακής, ειδικά για τις μεγάλες βλάβες (πχ στο πρόσωπο), όπου είναι δύσκολη η χειρουργική εκτομή. {2}, {81} Η επικουρική ακτινοθεραπεία έχει θέση στους ασθενείς με κίνδυνο λεμφαδενικής υποτροπής. Σε μία μελέτη, η οποία δημοσιεύθηκε το 2009, 615 ασθενείς οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια για υψηλή πιθανότητα λεμφαδενικής υπότροπης έλαβαν ή μη ακτινοβολία στο πεδίο των προσβλήθέντων λεμφαδένων. Ο υψηλός κίνδυνος βασίστηκε στον αριθμό (>4), στο μέγεθος (>3 cm), στην ανατομική θέση και σε παρουσία εξωκαψικής επέκτασης. Στην πενταετή παρακολούθηση, τοπική υποτροπή ανιχνεύθηκε μόνο στο 10% των ακτινοβοληθέντων ασθενών έναντι 40% στους μη ακτινοβοληθέντες ($p < 0.0001$). Μοναδική νοσηρότητα ήταν η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λεμφοιδήματος. {6}

4.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Το μελάνωμα μπορεί να κάνει μετάσταση σε κάθε εσωτερικό όργανο, με τον εγκέφαλο να αποτελεί μια ιδιαίτερα συνηθισμένη θέση. Το μεταστατικό μελάνωμα είναι συνήθως ανίατο, με επιβίωση ασθενών με σπλαχνικές μεταστάσεις συνολικά <1 έτος. Έτσι σκοπός της θεραπείας στους ασθενείς αυτούς είναι συνήθως η ανακούφιση. Οι ασθενείς με μεταστασεις μαλακών ιστών και λεμφαδένων είναι σε καλύτερη θέση από αυτούς με ηπατικές και εγκεφαλικές μεταστάσεις. Οι μεταστάσεις που περιορίζονται στους περιφερικούς λεμφαδένες (στάδιο III, κατά AJCC) χρήζουν θεραπευτικής εκτομής λεμφαδένων. Η χειρουργική εκτομή μιας μονής μετάστασης στον πνεύμονα ή μιας χειρουργικά προσβάσιμης εγκεφαλικής θέσης μπορεί να προσφέρει τοπική ανακούφιση από υποτροπιάζοντες όγκους ή μεταστάσεις. Οι ασθενείς που έχουν προχωρημένη τοπική νόσο, περιορισμένη σε ένα άκρο, μπορεί να ωφεληθούν από υπερθερμική έγχυση άκρου με μελφαλάνη. Ποσοστό υψηλής ολοκληρωμένης απάντησης έχουν αναφερθεί και οι απαντήσεις σχετίζονται με σημαντική ανακούφιση των συμπτωμάτων. {1}, {80}

4.8 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ- ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Για ασθενείς χωρίς νόσο, αλλά με υψηλό κίνδυνο μετάστασης η βοηθητική θεραπεία που συμπληρώνει το χειρουργείο είναι απαραίτητη για την καταστροφή των κρυφών μικρομεταστάσεων, την παράταση επιβίωσης – ελεύθερης νόσου και της βελτίωσης του ποσοστού ίασης. Πολλές στρατηγικές έχουν δοκιμαστεί. Η βοηθητική ιντερφερόνη (IFN) α2b μπορεί να είναι ικανή για τη βελτίωση επιβίωσης σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (νόσος σταδίου III). Η χορήγηση υψηλών δόσεων IFN α2b σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για υποτροπή έχει προταθεί με βάση τα αποτελέσματα τριών μελετών ECOG (E1684, E1690, E1694), στις οποίες αν και δε φάνηκε σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση, διαπιστώθηκε όφελος στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής. {84} Ωστόσο υψηλές δοσολογίες έχουν προκαλέσει σοβαρή τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένης μιας γριπώδους νόσου, η οποία όμως αντιστρέφεται γρήγορα με χαμηλότερες δόσεις. {1}, {80} Σημειώνεται ότι η IFN α2b μπορεί να αντικατασταθεί από πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη. Η μελέτη EORTC 18991 έδειξε ότι ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεθέν μελάνωμα σταδίου III είχαν στατιστικά σημαντικό

μεγαλύτερο τετραετές διάστημα ελεύθερο υποτροπής όταν έλαβαν pegIFNα σε σχέση με την ομάδα παρατήρησης (45.6% vs 38.9%). **{85}**

Ο ρόλος της χημειοθεραπείας είναι πλέον περιορισμένος και έχει θέση είτε σε ασθενείς που για οποιοδήποτε λόγο δεν δύναται να χορηγηθεί ανοσοθεραπεία ή βιολογική στοχεύουσα θεραπεία, είτε παρηγορητικά σε ασθενείς πολυθεραπευμένους, οι οποίοι έχουν πρόοδο νόσου μετά από μία ή δύο γραμμές θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες νεώτερης γενιάς.

Ένας αριθμός φαρμάκων και βιολογικών θεραπειών έχει αναδείξει ελάχιστη αντικαρκινική δράση (15-20% ποσοστά μερικής απάντησης) στο μεταστατικό μελάνωμα, όπως η δακαρβαζίνη (DTIC) – αλκυλιωτικός παράγων, οι νιτροζουρίες, καρβामουστίνη (BCNU), η λαμουστίνη (CCNU) και η σεμουστίνη (μεθυλ- CCNU), τα ανάλογα πλατίνας, όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη, τα αλκαλοειδή vincα, όπως η βινκριστίνη, η βινβλαστίνη και η βινδεσιδίνη, οι ταξάνες πακλιταξέλ και δοσεταξέλ, η IFN-α και η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) (ποσοστά απάντησης >50% έχουν παρατηρηθεί για την IL-2 για ενδοδερματική και υποδόρια νόσο, με μεγάλη ωστόσο τοξικότητα). **{1}, {86}, {87}**

Στην αρχή δοκιμάστηκαν υψηλές δόσεις ανασυνδυασμένης ιντερλευκίνης (600000-720000 iu/ kg, d 1-5, d 15-19 μέχρι 28 κύκλους θεραπείας) με αντικειμενικές ανταποκρίσεις στο 15-20% των ασθενών και πλήρη ανταπόκριση (CR) στο 4-6% των ασθενών. Σε μία αναδρομική ανάλυση 270 ασθενών που θεραπεύθηκαν με υψηλές δόσεις εφάπαξ στο National Cancer Institute (NCI) υπήρξε σημαντικό κλινικό όφελος για μία μειοψηφία ασθενών. Η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν στο 16% με μία μέση διάρκεια εννέα μηνών. Αν και το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης είναι μικρό, παρατηρήθηκε ότι το 59% των ασθενών με πλήρη κλινική ανταπόκριση παρέμεινε ελεύθερο νόσου στο διάστημα 7 έτων της παρακολούθησης της μελέτης. Όσον αφορά τις κατηγορίες των ασθενών, όσοι ήταν σε κακή γενική κατάσταση και όσοι είχαν λάβει προηγουμένως συστηματική θεραπεία είχαν πιο πτωχή ανταπόκριση. Ανταποκρίσεις επίσης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με μεγάλο φορτίο νόσου, ακόμη και με παρουσία σπλαγχνικών μεταστάσεων. Σημειώνεται επίσης, ότι οι ασθενείς με μερική ανταπόκριση, εφόσον ήταν εφικτό υποβλήθηκαν σε χειρουργική μεταστασεκτομή με καλά αποτελέσματα. Η θεραπεία με IL-2 παρουσιάζει σε μικρό ποσοστό μεν, αλλά σημαντικές ανταποκρίσεις δε. Πρέπει να χορηγείται, όμως μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα. Ο λόγος είναι η πολύ υψηλή τοξικότητα. Πιο συγκεκριμένα οι εν δυνάμει επιπλοκές από τη θεραπεία, οι οποίες οφείλονται στην υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IL-2, TNF α και IFNγ, είναι υπόταση, καρδιακές αρρυθμίες, πνευμονικό οίδημα, αυξημένη διαπερατότητα τριχοειδών και σήψη. **{86}, {87}**

Τρέχουσες δοκιμές προσπαθούν να καθορίσουν ανώτερους θεραπευτικά και πιο αποτελεσματικούς συνδυασμούς.

4.9 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το μελάνωμα θεωρείται ένας από τους πιο ανοσογονικούς τύπους καρκίνου. Μπορεί να εκφράσει αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας που μπορούν να αναγνωριστούν από τα ανοσοκύτταρα του ξενιστή. Αυτά τα σχετικά με το μελάνωμα αντιγόνα μόνα τους ή σε συνδυασμούς μπορεί να αναδείξουν νέες στρατηγικές αντιμετώπισης του. Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της ενεργοποίησης των T κυττάρων οδήγησε στην ανάπτυξη νέας γενιάς ανοσοθεραπείας. Οι στρατηγικές περιλαμβάνουν τη χρήση καθαρών καρκινικών πρωτεϊνών ως ανοσογόνα και τη χρήση γενετικά τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων, με σκοπό την απόσπαση απάντησης από τα κύτταρα T. Εναλλακτικές πειραματικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν προσπάθειες διερεύνησης των καρκινοειδικών T κυττάρων (είτε αποσπώμενα από τον όγκο ως ογκοδιηθημένα λεμφοκύτταρα, είτε αποσπώμενα από το περιφερικό αίμα μετά από εμβολιασμό) *in vitro* και μεταφοράς τους στους ασθενείς σε μεγάλους αριθμούς.

Ο πρώτος αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη είναι το ipilimumab, ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CTLA- 4 (cytotoxic T lymphocyte- 4), η οποία διεγείρει την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου. Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην επαναρρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να στραφεί εκ νέου έναντι των αντιγόνων σχετιζομένων με τον όγκο (tumor associated antigens) του μελανώματος. Η μελέτη η οποία οδήγησε στην έγκριση του ipilimumab ήταν μία μελέτη φάσης III -σε προθεραπευμένους με συστηματική θεραπεία ασθενείς- με αναλογία 3:1:1. 632 ασθενείς έλαβαν είτε ipilimumab με ένα εμβόλιο γλυκοπρωτεΐνης (gp100), ipilimumab μονοθεραπεία είτε gp100. Ήταν HLA-A0201 θετικοί και έλαβαν 4 δόσεις ipilimumab ανά 3 εβδομάδες (3mg/kg). Στους ασθενείς, που τρεις μήνες μετά την τελευταία χορήγηση είχαν ανταπόκριση (πλήρη, μερική ή σταθεροποίηση) στη νόσο, ήταν δυνατό να επαναχορηγηθεί το σχήμα. Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο ήταν η ολική επιβίωση. Στις ομάδες που έλαβαν ipilimumab η ολική επιβίωση ήταν στους 12 μήνες 44%, 46% αντίστοιχα έναντι 25% (μονοθεραπεία gp100). Στους 24 μήνες ήταν 22%, 24% και 14% αντίστοιχα στις 3 ομάδες με στατιστικά σημαντική διαφορά. {88} Όσον αφορά τον περιορισμό στους ασθενείς με HLA-A0201+, μία αναδρομική ανάλυση από τέσσερις μελέτες φάσης II, ανέδειξε ότι η αποτελεσματικότητα του ipilimumab ήταν η ίδια, ανεξάρτητα του HLA status. {89} Είναι αποτελεσματικό σε περίπου 15% των ασθενών που έχει χρησιμοποιηθεί, χωρίς να έχει βρεθεί

κάποιος βιοδείκτης που να προσδιορίζει ποια υποομάδα των ασθενών έχει όφελος από τη θεραπεία αυτή. Φαίνεται πως είναι κατάλληλο για μονοθεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένη μεταστατική νόσο. {86}, {87}

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο ορόσημο PD-1 (program death protein) και τη συνδετική του πρωτεΐνη PDL-1. Ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης PD-1/ PDL-1 μπορεί να ξεπεράσει την ανοσολογική αντίσταση. Το PD-1 είναι ένας υποδοχέας ανοσολογικού ελέγχου που εκφράζεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Το PD-1 ενώνεται με τον προσδέτη του (ligand) στα καρκινικά κύτταρα και προκαλεί ανοσοκαταστολή, εμποδίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα να απορρίψει τον όγκο. Επομένως η στόχευση έναντι του PD-1 ή του προσδέτη του έχει τη λογική της ενίσχυσης της ανοσιακής απάντησης έναντι του όγκου. Τα nivolumab & pembrolizumab είναι πιο αποτελεσματικά της χημειοθεραπείας, σε ασθενείς με προχωρημένη ασθένεια. Παρουσιάζουν επίσης σημαντική μείωση του όγκου σε σχέση με τη μονοθεραπεία με ipilimumab, αποτελεσματικά σε περίπου 30- 40% των ασθενών που το δοκίμασαν. Έχει αδειοδοτηθεί στις ΗΠΑ και χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη, ενώ είναι σε φάση έγκρισης στη Ευρωπαϊκή Ένωση.

Το nivolumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο δοκιμάστηκε αρχικά σε μία μελέτη φάσης I/II με αύξηση δόσης σε 107 ασθενείς. Η δόση κυμαινόταν από 0,1 μέχρι 10 mg/kg, με χορήγηση ανά δύο εβδομάδες για διάστημα μέχρι 96 εβδομάδες. Όλοι οι ασθενείς είχαν προχωρημένη νόσο, το 78% είχε σπλαγχνικές μεταστάσεις και το 36% ανεβασμένη LDH. Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν πολυθεραπευμένοι, αφού το 62% είχε λάβει τουλάχιστον δύο θεραπείες. Τα αποτελέσματα, 14 μήνες μετά την ένταξη των τελευταίων ασθενών έδειξαν διάμεση επιβίωση 17 μηνών, με μονοετή και διετή ολική επιβίωση στο 63% και 42% των ασθενών αντίστοιχα. Η αντικειμενική ανταπόκριση, σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST ήταν 31%. Στην παρούσα φάση είναι υπό εξέλιξη μελέτες φάσης III. {90}

Παρόμοιας λογικής μονοκλωνικό αντίσωμα είναι το lambrolizumab. Έχει εκτεταμένα μελετηθεί σε μία προοπτική μη τυχαιοποιημένη μελέτη. 135 ασθενείς έλαβαν lambrolizumab σε ένα από τα τρία ακόλουθα δοσολογικά σχήματα (10 mg/kg q2w, 10 mg/kg q3w, 2mg/kg q2w0. Το 38% των ασθενών, σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST, είχε ανταπόκριση. Το πιο ενεργό από τα τρία δοσολογικά σχήματα ήταν το πρώτο (10mg/kg q2w) με τις ανταποκρίσεις να αγγίζουν το 50%. Ήταν γενικά καλά ανεκτή θεραπεία με κύριες παρενέργειες εξάνθημα, κνησμό, διάρροια και κόπωση. {6}, {91}

Ωστόσο με τη χρήση των νέων θεραπευτικών μεθόδων προέκυψαν σοβαρές παρενέργειες και υψηλότερη τοξικότητα, που περιλαμβάνουν σοβαρή κολίτιδα, διάμεση πνευμονίτιδα και ηπατίτιδα, δυνητικά θανατηφόρες, ανεπάρκεια της υπόφυσης, ανεπάρκεια

επινεφριδίων, υποθυρεοειδισμός, εξανθήματα, λεύκη καθώς και νευροπάθεια. {92}, {93}, {94}, {95}

Ελπιδοφόρα αποτελέσματα έχει δείξει επίσης η συγχορήγηση ipilimumab με nivolumab, καθώς τα πρώτα αποτελέσματα δεικνύουν αυξημένες κλινικές ανταποκρίσεις. Σε μελέτη φάσης I, η κοόρτη των ασθενών που έλαβε συγχορήγηση, η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν 40% (21/51), εκ των οποίων οι 16/21 είχαν >80% μείωση στο φορτίο νόσου. Επίσης τα δεδομένα δείχνουν ότι οι ανταποκρίσεις είναι μακράς διαρκείας φθάνοντας μέχρι τις 72 εβδομάδες. Από την άλλη πλευρά, όμως, αναφέρθηκαν ανεπιθύματα συμβάματα στο 49% των ασθενών με πιο συχνά ηπατολογική, νεφρολογική και γαστρεντερική τοξικότητα. Το 21% αναγκάστηκε να διακόψει τη θεραπεία λόγω τοξικότητας. Αναμένονται, και εδώ, τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένης μελέτης φάσης III στην οποία συγκρίνεται η συγχορήγηση nivolumab-ipilimumab με κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα χωριστά. Όπως με το nivolumab, βρίσκεται σε εξέλιξη μελέτη συγχορήγησης lambrolizumab με ipilimumab. {6}, {91}

4.10 ΣΤΟΧΕΥΟΥΣΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, στο μελάνωμα εμφανίζονται συχνά μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK), οι οποίες οδηγούν σε ογκογενετικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφυγή από την απόπτωση. Αρχικά ανακάλυφθηκαν οι μεταλλάξεις στο NRAS (15%). Το 2002 οι Davies et al. ανέφεραν την παρουσία μετάλλαξης στο BRAF γονίδιο στο 40-50% των μελανωμάτων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK. {96} Ήταν κυρίως εντοπιζόμενη στο νουκλεοτίδιο 1799 και αφορούσε μία σημειακή μετάλλαξη που οδηγούσε σε αλλαγή στο V600E αμινοξύ με αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος από βαλίνη. Αφορούσε >90% των μεταλλάξεων του BRAF. Σε μικρά ποσοστά ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στην ίδια θέση (V600), αλλά η αντικατάσταση αφορούσε άλλα αμινοξέα (V600D, V600K, V600R). {97} Από μελέτες που ακολούθησαν, φάνηκε ότι η μετάλλαξη στο BRAF ήταν αρνητικός προγνωστικός δείκτης. {98} Επίσης, φάνηκε ότι εκτός από την άμεση καρκινογόνο δράση στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK, οι μεταλλάξεις στο BRAF έχουν αντίκτυπο στο μικροπεριβάλλον του όγκου, προάγοντας έμμεσα στην καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα στην παραγωγή ανοσοκατασταλτικών και αγγειογενετικών παραγόντων ενισχύοντας την ανοσοδιαφυγή και αιμάτωση του όγκου αντίστοιχα. {99}

Ισχυροί εκλεκτικοί ανταγωνιστές του μεταλλαγμένου BRAF χρησιμοποιούνται στο μεταστατικό μελάνωμα με υψηλή αποτελεσματικότητα (συρρίκνωση όγκου) στο 90% των ασθενών σε 6-9 μήνες. **{100}** Αρχικά δοκιμάστηκε το sorafenib, ένας αναστολέας των υποδοχέων του VEGF και των κινασών του RAF (BRAF και CRAF) με θετικές μελέτες σε άλλες νεοπλασίες, όπως το ηπάτωμα, το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και το καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Εντούτοις τυχαιοποιημένες μελέτης φάσης III απέτυχαν να δείξουν όφελος έναντι της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας. Ακολούθησαν κλινικές δοκιμές με άλλους ευρέως φάσματος αναστολείς κινασών με ελαφρά βελτιωμένη εκλεκτικότητα για BRAF σε σύγκριση με το sorafenib, όπως με το RAF265 και XL281. Ειδικά με το RAF265, αν και διαπιστώθηκαν ανταποκρίσεις σε κοόρτες ασθενών, η καθημερινή χορήγηση οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενες τοξικότητες, όπως διαταραχές όρασης, πνευμονική εμβολή, δυσλιπιδαιμίες, διάρροιες και μυελοκαταστολή. Οι παραπάνω σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες ώθησαν στη διακοπή περαιτέρω μελετών. Εκτός από τους RAF αναστολείς, μόρια που θα αναστέλλουν το MEK δοκιμάστηκαν, όπως το selumetinib. Σε ασθενείς, όμως με NRAS, BRAF μεταλλάξεις με μεταστατικό μελάνωμα που χορηγήθηκε selumetinib δεν φάνηκε κλινικό όφελος σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε τεμοζολαμίδη. **{101}**

Η αποτυχία των προαναφερθέντων μορίων, καθώς και άλλων οδήγησε σε προσπάθειες για σχεδιασμό φαρμάκων με πιο εκλεκτική δράση. Πράγματι, με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας σχεδιάστηκε το vemurafenib, το οποίο προκαλεί εξαιρετικά ισχυρή αναστολή στο V600E, εμποδίζοντας την περαιτέρω ενεργοποίηση του άξονα, καταλήγωντας στο ERK. Τα εντυπωσιακά αποτελέσματα τόσο στην κλινική ανταπόκριση όσο και στην ολική επιβίωση σε μελέτες φάσης I και II, οδήγησε στο σχεδιασμό μίας μελέτης φάσης III (μελέτη BRIM III). 675 ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα και μετάλλαξη στο V600E τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε vemurafenib (960mg bid) είτε dacarbazine (1000mg/m² q21d) ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής μέχρι πρόοδο νόσου. Παρατηρήθηκε αύξηση της ολικής επιβίωσης στην ομάδα του vemurafenib (OS: 13.6 έναντι 9.7 m, HR= 0.70), καθώς και στο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (PFS: 6.9 vs 1.6 m). Τα προαναφερθέντα εντυπωσιακά αποτελέσματα οδήγησαν το FDA στην έγκριση του vemurafenib ως θεραπεία 1ης γραμμής στους ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα και μετάλλαξη στο V600. **{102}**

Ένας άλλος εκλεκτικός αναστολέας του BRAF V600, ο οποίος έλαβε έγκριση από το FDA τον 5/2013 είναι το dabrafenib. Είναι ένας αναστρέψιμος αναστολέας του μεταλλαγμένου BRAFV600, έχοντας παρόμοιο τρόπο δράσης και φαρμακοδυναμικά αποτελέσματα με μόνη διαφορά το μικρότερο χρόνο ημισείας ζωής (5.2 vs 50 hrs). Σε μία μελέτη φάσης III, 250 ασθενείς με μη εξαιρέσιμο μελάνωμα σταδίου III ή IV τυχαιοποιήθηκαν σε αναλογία 3:1 να

λάβουν είτε dabrafenib (150mg bid) είτε dacarbazine (1000 mg/m² q21d). Όλοι έφεραν τη μετάλλαξη BRAF V600. Το πρωτεγενές καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS: 6.7 vs 2.7m), το οποίο ήταν στατιστικά σημαντικό (HR=0.35) Η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν 50% στο σκέλος του dabrafenib (93/187 pts) έναντι 6% στο σκέλος της dacarbazine. Τέλος, αν και δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση, σημειώνεται ότι υπήρχε crossover στη μελέτη, καθώς σημαντικός αριθμός ασθενών που είχαν πρόοδο νόσου υπό dacarbazine έλαβαν στη συνέχεια dabrafenib. **{103}**

Όσον αφορά τους ασθενείς με παρουσία εγκεφαλικών μετάστασεων, πρόκειται για μία μεγάλη ομάδα ασθενών (10-40%) με πολύ πτωχή πρόγνωση. Η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία έχει δώσει πολυ μικρές ανταποκρίσεις (<10%) με μία διάμεση επιβίωση 3-5 μηνών. **{104}** Σε μία μελέτη φάσης II, το dabrafenib έδειξε ανταποκρίσεις σε 172 ασθενείς με τεκμηριωμένες εγκεφαλικές μεταστάσεις και μεταλλάξεις στο BRAF V600E και V600K. Υπήρξε ενδοκρανιακή ανταπόκριση στους ασθενείς με BRAF V600E της τάξης του 39% και 31% αντίστοιχα, χωρίς ή με προηγούμενη ακτινοβολία. **{105}** Στους ασθενείς με μετάλλαξη στο BRAF V600K η ανταπόκριση ήταν της τάξης του 15%. Ένας μόνο ασθενής παρουσίασε εγκεφαλική αιμορραγία. Το vemurafenib, επίσης έχει δείξει σε case reports ανταποκρίσεις και για αυτό το λόγο βρίσκεται σε εξέλιξη μελέτη φάσης II, η οποία θα αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου. Από τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι είναι ασφαλής και αποτελεσματική η χορήγηση των BRAF V600 αναστολέων στους ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις.

Το προφίλ τοξικότητας, τόσο του vemurafenib όσο και του dabrafenib, είναι σαφώς καλύτερο με επιπλοκές κατά κανόνα σε μικρότερη έκταση και διαχειρίσιμες. Οι πιο συχνές παρενέργειες είναι δερματολογικές (εξάνθημα, αντιδράσεις υπερευαισθησίας, υπερκεράτωση). Επίσης παρουσιάζονται συχνά αρθραλγίες, αλωπεκία, ναυτία και διάρροιες. Οι παραπάνω ανεπιθύμητες ενέργειες έχουν αναφερθεί στο 15% περίπου των ασθενών. **{106}** Κλινικά σημαντική επιπλοκή, η οποία εμφανίζεται τόσο στη χορήγηση vemurafenib όσο και στη χορήγηση dabrafenib -λίγες εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας- είναι η παρουσία κερατοακανθωμάτων σε ποσοστά 19% και 26% αντίστοιχα. Η αντιμετώπιση γίνεται με χειρουργικό καθαρισμό, χωρίς να απαιτείται διακοπή ή μείωση δόσης. Από έλεγχο των κερατοακανθωμάτων βρέθηκε ότι φέρουν μετάλλαξη στο HRAS. Για αυτή την ιδιαίτερη ανεπιθύμητη ενέργεια φαίνεται ότι ευθύνεται η παράδοση ενεργοποίησης της σηματοδότησης του RAF μέσω ενεργοποίησης του CRAF, γεγονός απότοκο της αναστολής του BRAF. Κάποιες άλλες τοξικότητες ειδικές για το vemurafenib είναι η επιμήκυνση του QT και η περιφερική πάρεση του προσωπικού νεύρου, ενώ για το dabrafenib είναι η πυρετική αντίδραση

(28%) των ασθενών, καθώς και η υπεργλυκαιμία (6% των ασθενών χρειάστηκε θεραπευτική παρέμβαση). {107}

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΕΞΕΛΙΞΗ {108}

Table 2 Clinical trials in progress		
Phase	Drugs	Targets
II	Vemurafenib followed ipilimumab	Immunotherapy plus BRAFi
II	LGX818 + MEKi/CDK4,6/FGFR/PI3Ki/METi	Sequential TKi
III	Pembrolizumab + dabrafenib + trametinib	Anti-PD1 + BRAFi + MEKi
III	MEDI4736 + dabrafenib + trametinib	Anti-PDL1 + BRAFi + MEKi
I	Dabrafenib ± trametinib + ipilimumab	Anti-CTLA4 + BRAFi/MEKi
III	Vemurafenib + BKM120	BRAFi + PI3Ki
III	Dabrafenib + GSK2141795	BRAFi + AKTi
III	Vemurafenib + P1446A-05	BRAFi + CDKi
I	Dabrafenib, trametinib, ipilimumab sequent	BRAFi, MEKi, anti-CTLA4
I	GDC-0941 + cobimetinib	PI3Ki + MEKi
I	BKM120 + MEK162	PI3Ki + MEKi

Εκλεκτικοί αναστολείς των MEK 1/2 βελτιώνουν τη συνολική επιβίωση των σθενών με μελάνωμα. Ο συνδυασμός τους με τους εκλεκτικούς αναστολείς BRAF είναι αποτελεσματικότερος από τη μονοθεραπεία, καθώς υπερνικά τους επίκτητους μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς BRAF. {6}

Το trametinib είναι ένας ισχυρός, εκλεκτικός αναστολέας των MEK1/2. Αρχικά εγκρίθηκε από το FDA για τη θεραπεία ασθενών οι οποίοι είχαν προθεραπευθεί με αναστολέα BRAF για προχωρημένο μελάνωμα που έφερε μεταλλάξεις BRAF V600E, K. {109} Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη φάσης III Metric, 322 ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα τυχαιοποιήθηκαν σε αναλογία 2:1 είτε σε trametinib (2 mg qd) είτε σε χημειοθεραπεία (dacarbazine ή paclitaxel). Όλοι οι ασθενείς έφεραν μεταλλάξεις είτε στο V600E είτε στο V600K. Κανένας εκ των ασθενών δεν είχε λάβει προηγούμενη θεραπεία με BRAF αναστολείς, ενώ 33% και 30% είχαν λάβει είτε χημειοθεραπεία είτε ανοσοθεραπεία αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου, το οποίο ήταν και το πρωτογενές καταληκτικό σημείο, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένο στο σκέλος του trametinib έναντι της χημειοθεραπείας (4.8 vs 1.5 m, HR=0.45). Επίσης σημαντικά βελτιώθηκε η ολική επιβίωση με 81% εξάμηνη επιβίωση στο σκέλος του trametinib έναντι 67% στο σκέλος της χημειοθεραπείας (HR=0.54). Επισημαίνεται ότι υπήρξε διαφορά στην επιβίωση, παρόλο

που επιτράπη το crossover και ασθενείς στο σκέλος χημειοθεραπείας έλαβαν trametinib. Οι κύριες παρενέργειες ήταν εξάνθημα, διάρροιες και περιφερικό οίδημα. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν αναφέρθηκαν περιστατικά κερατοακανθώματος. Σε ένα 7% των ασθενών παρατηρήθηκε μειωμένο κλάσμα εξώθησης, αλλά σε μόνο 2 ασθενείς (1%) έγινε μόνιμη διακοπή του φαρμάκου. Τέλος σε ένα 9% παρουσιάσθηκαν οφθαλμικά συμβάματα με κύριο εύρημα τη θολή όραση. {110}

Η αποτελεσματικότητα του trametinib ώθησε τους ερευνητές να μελετήσουν τη συγχορήγηση με dabrafenib έχοντας ως στόχο να υπερνικηθεί η επίκτητη αντίσταση στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Σε μία μελέτη φάσης I/II οι Infante et al. έδειξαν ποσοστό ανταπόκρισης στον όγκο 15% σε ασθενείς οι οποίοι είχαν αναπτύξει αντίσταση στο vemurafenib. Ακολούθησε μία τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II στην οποία σε 162 ασθενείς που έφεραν μετάλλαξη στο V600 και δεν είχαν λάβει αναστολείς του BRAF χορηγήθηκε είτε dabrafenib μονοθεραπεία (150mg bid), είτε dabrafenib με trametinib (150mg bid, 1mg qd αντίστοιχα), είτε dabrafenib (150mg bid) με trametinib 2 mg qd). Οι ασθενείς στο 3ο σκέλος (dabrafenib 150 mg bid, trametinib 2mg qd) εμφάνισαν βελτιωμένα ποσοστά ανταπόκρισης 76% έναντι 54% στο σκέλος με μονοθεραπεία dabrafenib, καθώς και στατιστικά σημαντικό μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου. {110} Όσον αφορά τη δερματολογική τοξικότητα, η οποία εκδηλώνεται με παρουσία πλακώδους καρκινώματος δέρματος ήταν σημαντική μειωμένη (7% vs 19%). Φαίνεται ότι η προσθήκη του αναστολέα MEK εμποδίζει την παράδοση ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK που συνέβαλε στη δημιουργία δερματικών βλαβών. Από την άλλη πλευρά τα ποσοστά πυρεξίας αυξήθηκαν (71% vs 26%). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τον 1/2014 εγκρίθηκε από το FDA ο συνδυασμός dabrafenib/trametinib ως θεραπεία 1ης γραμμής στους ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα που φέρουν τις μεταλλάξεις στο BRAF V600E και V600K. Σύντομα ολοκληρώνεται η μελέτη φάσης III του παραπάνω συνδυασμού, ενώ ταυτόχρονα τρέχει μία μελέτη φάσης III, η οποία συνδυάζει το vemurafenib με ένα νέο αναστολέα του MEK 1/2, το cobimetinib vs placebo. {6}, {108}

4.11 ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.11.1 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η χρήση Next Generation Sequencing (NGS) βοήθησε στον καθορισμό miRNAs ως σημαντικών βιοδεικτών για την διάγνωση και πρόγνωση του μελανώματος. {70}

Οι Shiiyama et al (2013) μελετώντας το προφίλ έκφρασης 2000 miRs στο πλάσμα ασθενών με μελάνωμα ταυτοποίησε 6 miRs (9, 145, 150, 155, 203, 205) με σημαντική διαφορά έκφρασης σε ασθενείς με μεταστατική νόσο. {70}, {111}

Σε μελέτη των Kozubek et al (2013) έγινε ανάλυση του μεταγραφώματος των miRs σε βιοψίες φυσιολογικού δέρματος, καλοήθων σπύλων αλλά και δειγμάτων μελανώματος (τόσο πρωτοπαθούς όσο και μεταστατικού. Μειωμένα στο μελάνωμα σε σχέση με τους καλοήθεις σπύλους: miR- 203, miR- 204-5p, miR- 205, miR- 211-5p, miR- 23b, miR- 26a & miR-26b. Μειωμένα στο μελάνωμα σε σχέση με το φυσιολογικό δέρμα: miR-144-3p, miR- 181b-5p, miR- 320a, miR- 320c, miR- 320d and miR- 451a. {70}, {112}

Με τη χρήση qRT-PCR πιστοποιήθηκε ο ρόλος του miR-211, το οποίο εμποδίζει την εισβολή στις κυτταρικές σειρές του μελανώματος, ενώ η θέση του είναι στο ιντρόνιο του ογκοκατασταλτικού μελαστατίνη-1. Το miR- 211 συμβάλλει επίσης στο διαχωρισμό κοινών σπύλων από το μελάνωμα, αλλά και των κοινών σπύλων με τους δυσπλαστικούς. {70}, {112}, {113}

Βάσει της βιβλιογραφικής ανασκόπησης έχει διαπιστωθεί ότι διαφορετικά miRNAs χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μελανώματος- φυσιολογικού δέρματος σε σχέση με μελάνωμα – καλοήθων σπύλων. {70}, {113}, {114}

4.11.2 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (MiRNAs) ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σε μελέτη των Reuland et al (2013) ταυτοποιήθηκε ο ρόλος του miR26a-downregulation στα κύτταρα του μελανώματος σε σχέση με τα αρχικά μελανοκύτταρα - επαγωγή του κυτταρικού θανάτου - μείωση επιπέδου έκφρασης πρωτεϊνών BAG4/SODD (παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων του μελανώματος από την απόπτωση) & SMAD1. {115}, {116}

Οι Wagenseller et al (2013) μελέτησαν το συνολικό προφίλ έκφρασης των miRNAs σε ιστούς μελανώματος, με τη χρήση μικροσυστοιχιών σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία αντικαρκινική και αναστολέων αγγειογένεσης (temsirolimus & bevacizumab). Διαπιστώθηκαν 15 miRNAs υπερρυθμιζόμενα (significant upregulation), 12 εκ των οποίων είχαν ογκοκατασταλτική δράση στοχεύοντας 15 ογκογονίδια. Χρηζουν περαιτέρω διερεύνησης στο μέλλον. {117}, {118}, {119}, {120}

Νέες μέθοδοι μπορούν να αναπτυχθούν στο μέλλον, μία εκ των οποίων είναι η θεραπευτική συνέργεια miRNA και siRNA. Ο διπλός αποκλεισμός ενός συγκεκριμένου

ογκογονιδίου δείχνει να εξασφαλίζει βελτιωμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα. {70}, {121}, {122}, {123}

Θεραπευτική στρατηγική στο μεταστατικό μελάνωμα αποτελεί η αντικατάσταση του miR26a, ενώ ο SODD είναι δυνητικά σημαντικός θεραπευτικός στόχος, ο οποίος χρήζει περαιτέρω μελέτης. {117}, {122}

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. MiRNAs ως προγνωστικοί δείκτες και θεραπευτικοί στόχοι {70}			
	Type of biomarker	Name	Expression
Prognostic and diagnostic miRNAs	Circulating miRNAs	miR-9, miR-145, miR-150 miR-155, miR-203, miR-205	Upregulation
		miR-150, miR-15b, miR-339 miR-199a-5p and miR-424	Upregulation
		Identification of 51 miRNAs	Dysregulation
		miR-221	Upregulation
		Identification of 84 miRNAs	
	miRNAs in solid tumors	Identification of 70 miRNAs	Dysregulation
		let-7b miR-199	Downregulation Upregulation
		miR-203, miR-204-5p, miR-205-5p, miR-211-5p, miR-23b-3p, miR-26a-5p and miR-26b-5p	Downregulation
		miR-146, miR-27 miR-877 miR-186	
		miR-203 miR-205	Upregulation Upregulation
		miR-15b miR-210 miR-34a	Upregulation Upregulation Downregulation
		Identification of 15 miRNAs	Upregulation
		miR-26a	Downregulation
Therapeutic miRNAs			

4.12 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΙΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

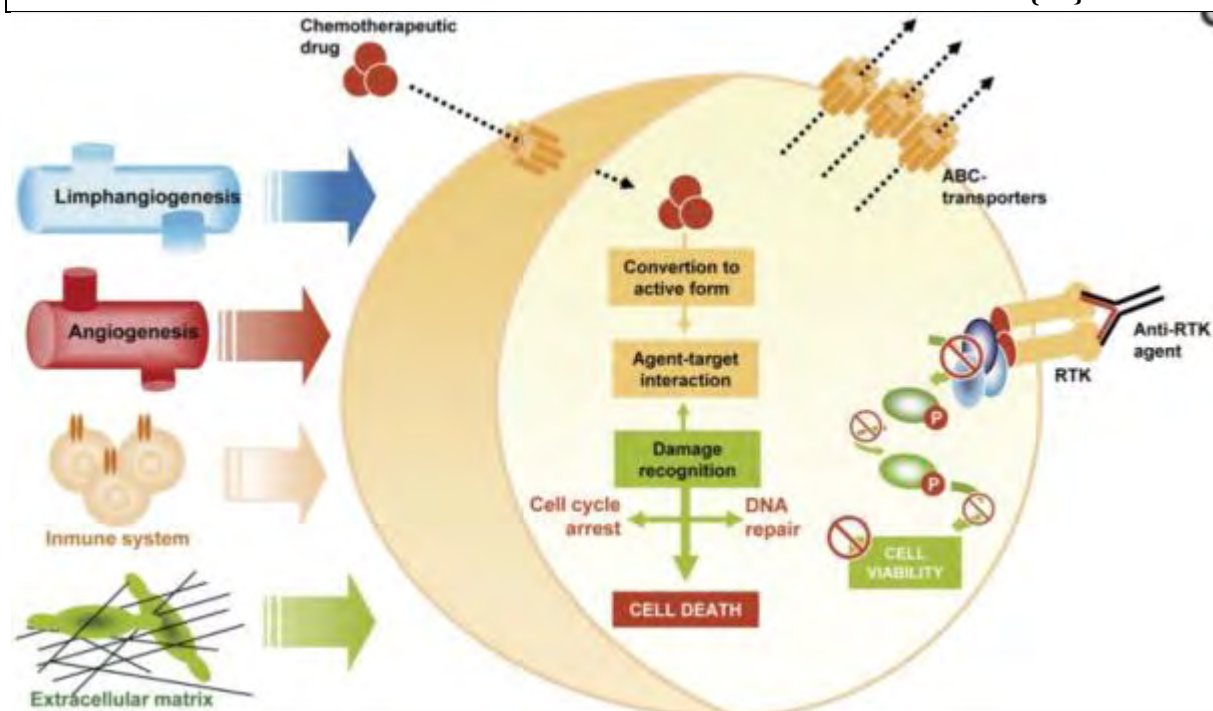
Οι θεραπείες με αναστολή του BRAF παράγουν αντικειμενικές ανταποκρίσεις στην πλειοψηφία των ασθενών, επιμηκύνοντας τη διάμεση επιβίωση σε σχέση με τη χημειοθεραπεία. Εντούτοις, οι ανταποκρίσεις είναι μερικές και αντίσταση στη θεραπεία εμφανίζεται κατά μέσο όρο 5-7 μήνες μετά την έναρξή της. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι το 20% των ασθενών που υποβάλλονται σε στοχεύουσα θεραπεία παρουσιάζουν πρόοδο νόσου μέσα στις πρώτες εβδομάδες. {57} Η αντίσταση στη στοχεύουσα θεραπεία μπορεί να διακριθεί σε δύο βασικές κατηγορίες, την εγγενή και την επίκτητη (EIKONA 14).

Οι μηχανισμοί της εγγενούς αντίστασης παραμένουν ανεπαρκώς μελετημένοι. Σε μία σειρά 14 ασθενών, οι οποίοι εμφάνισαν πρόωμη αντίσταση στη θεραπεία με BRAF αναστολείς, οι Van Allen et al. εντόπισαν σε 3/14 ασθενείς μετάλλαξη στο RAC 1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε αντοχή στη θεραπεία με BRAF V600 αναστολείς. {124} Από έναν ασθενή 26 ετών με πρωτογενή αντίσταση στη θεραπεία με vemurafenib έλαβε δείγματα από πέντε διαφορετικές μεταστατικές εστίες προκειμένου να μελετήσει με ανάλυση του γονιδιώματος πιθανούς μηχανισμούς φαρμακευτικής εγγενούς αντίστασης. Η ανωτέρω μελέτη κατέληξε στα ακόλουθα πολύ σημαντικά συμπεράσματα: i) Όλοι οι κλώνοι έφεραν τη μετάλλαξη της BRAF V600E, ii) Σε όλους τους κλώνους διαπιστώθηκε απώλεια στο χρωμόσωμα 10 με αποτέλεσμα την απαλοιφή τεσσάρων ζευγών βάσεων από το PTEN και επακόλουθη απώλεια του, iii) Μετάλλαξη στο κωδικόνιο Q209P του γονιδίου GNAQ εντοπίστηκε σε όλους τους κλώνους. Αυτή η μετάλλαξη καθιστά τα κύτταρα του μελανώματος ανθεκτικά στη θεραπεία με BRAF αναστολείς με μόνιμη ενεργοποίηση του ERK. Οι ερευνητές προχώρησαν ένα βήμα παραπέρα. Σε κυτταρικές γραμμές μελανώματος από αυτόν τον ασθενή απενεργοποίησαν τη μετάλλαξη μέσω απαλοιφής του RNAi και έδειξαν ότι τα κύτταρα απέκτησαν ευαισθητοποίηση έναντι των αναστολέων BRAF, iv) Η εγγενής αντίσταση λαμβάνει χώρα μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών διάφορων του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK. Αντίσταση στη χορήγηση BRAF αναστολέων με μηχανισμό επιβίωσης ανεξάρτητο του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού έχει περιγραφεί ακόμη μέσω της υπερέκφρασης και υπερενεργοποίησης του PDGFR β (platelet derived growth factor receptor β) και του IGFR-1 (insulin-like growth factor receptor 1). Το αποτέλεσμα είναι να προκαλείται ογκογενετική σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K-AKT-mTOR. {74}, {125}

Η πιο συχνή αντίσταση στις θεραπείες με BRAFV600 αναστολείς, η επίκτητη εμφανίζεται σε δεύτερο χρόνο και επιτυγχάνεται με μηχανισμούς εξαρτώμενους από το MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι. Σε ένα ποσοστό 30% περίπου των ασθενών αλλαγές στο BRAF έχουν περιγραφεί, όπως ενίσχυση του γονιδίου BRAF ή αποκοπή της πρωτεΐνης BRAF που καταλήγουν σε αυξημένο διμερισμό. Τα προαναφερθέντα συμβάματα έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης. {126} Επιπλέον, δευτερογενείς μεταλλάξεις στο NRAS και MEK (άνω και κάτω του BRAF στο σηματοδοτικό μονοπάτι αντίστοιχα) έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα ιστών ασθενών, των οποίων η νόσος έχει επιδεινωθεί υπό θεραπεία με BRAF αναστολείς. {127} Έχει επίσης περιγραφεί υπερέκφραση της MAPK πρωτεΐνης μέσω της κινάσης Osaka thyroid, η οποία ενεργοποιεί το ERK μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από το MEK χωρίς να χρειάζεται σηματοδότηση μέσω του RAF. {74}, {128}

Αλκυλιωτικοί παράγοντες επίσης δρουν, επηρεάζοντας της δραστηριότητα της φαρμακευτικής αγωγής, αλλά και την αποτελεσματικότητα αυτής. Ο ρόλος της MGMT (μεθυλ- γουανίνη- DNA μεθυλοτρανσφεράσης) στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, που σχετίζονται με τη δράση φαρμάκων είναι καθοριστικός. Η MGMT απενεργοποιεί τις αλλαγές, βελτιώνει τη δράση των φαρμάκων, αποφεύγοντας τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης του κυτταρικού θανάτου. {57}

ΕΙΚΟΝΑ 20. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ {57}



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και μεθόδων, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing- NGS) ενεργοποίησε έναν ολοκληρωμένο έλεγχο μεταλλάξεων σε επίπεδο πολυγονιδιακών πάνελ, γονιδιώματος και πρωτεώματος. Επίσης μελέτες GWAS (Genome- Wide Association Studies) ταυτοποίησαν τους γενετικούς ρυθμιστές του μελανώματος, δίνοντας μια πιο πλήρη εικόνα των περιοχών αλλά και των αλλαγών που συσχετίζονται με το κακόηθες μελάνωμα. Οι εξελίξεις στη γενωμική τεχνολογία αλλά και στη μοριακή βιολογία έχουν επιταχύνει την ταυτοποίηση πολλαπλών γενετικών τόπων, αλλά και γονιδίων με άμεση συσχέτιση με το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης του κακοήθους μελανώματος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μια πολυδιάστατη εμπλοκή πολλαπλών επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, της ρύθμισης της δομής της χρωματίνης, αλλά και των διαφόρων δραστηριοτήτων των μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs & lncRNAs). Η γένεση και εξέλιξη του μελανώματος προκύπτει από πολύπλοκες αλλαγές σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ικανότητα αποφυγής της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου και της απόπτωσης.

Εξαιρετικής σημασίας είναι η ταυτοποίηση από το θεράποντα ιατρό των ασθενών με υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη μελανώματος. Αυτό θα προκύψει μέσω της λεπτομερούς εξέτασης ολόκληρου του δέρματος των ασθενών, με έμφαση στους ύποπτους σπίλους, αλλά και μέσω της καταγραφής του αριθμού των σπίλων και τακτική παρακολούθησή τους. Η ενδελεχής λήψη ιστορικού, ατομικού και οικογενειακού, με καταγραφή όλων των τύπων καρκίνου που έχουν παρατηρηθεί στις οικογένειες, που είναι ύποπτες για εμφάνιση μελανώματος είναι πολύ σημαντική, καθώς θα κατευθύνει τη γενετική συμβουλευτική, καθώς και τον πιθανό γενετικό έλεγχο.

Οι ενδείξεις για γενετικό έλεγχο σε έναν ασθενή είναι οι εξής: τουλάχιστον δύο ιστολογικά αποδεδειγμένες περιπτώσεις κακοήθους δερματικού μελανώματος να έχουν διαγνωστεί πριν την ηλικία των 75 ετών σε δύο 1^{ου} ή 2^{ου} βαθμού συγγενείς του ίδιου ατόμου. Η παρουσία στο ίδιο άτομο ή σε έναν συγγενή κακοήθους δερματικού μελανώματος ταυτόχρονα με οφθαλμικό μελάνωμα, καρκίνο του παγκρέατος, του νεφρού, μεσοθηλιώματος ή ενός όγκου του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Στα επόμενα πέντε χρόνια αναμένεται η δημιουργία πολυγονιδιακών πάνελ και η ευρεία χρήση τους σε ασθενείς υψηλού κινδύνου στα πλαίσια προσυμπτωματικά ελέγχου (screening).

Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του κακοήθους μελανώματος, τα κλινικά αποτελέσματα, ειδικά για το μεταστατικό μελάνωμα παραμένουν ιδιαίτερα φτωχά. Η αυξανόμενη κατανόηση σε βάθος της μοριακής βάσης και βιολογίας των μη κωδικών μορίων RNA δημιουργούν προσδοκίες για τη μελλοντική τους χρήση στη διάγνωση, την πρόγνωση αλλά και τη θεραπεία ασθενών με μελάνωμα. Παρά την πληθώρα των δεδομένων που προκύπτουν από τις μελέτες των τελευταίων ετών, απαραίτητη είναι η περαιτέρω έρευνα ιδιαίτερα όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα των βιοδεικτών αλλά και των θεραπευτικών μεθόδων. Τα μικρά και τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA, καθώς και συνδυασμός αυτών στη θεραπευτική αντιμετώπιση και την πρόγνωση της νόσου, αποτελούν πρόκληση για το μέλλον.

Αναφορικά με το τι περιμένουμε από τις μελλοντικές έρευνες, η καθιέρωση ολοκληρωμένων συνόλων δεδομένων, συνδυάζοντας μελέτες WES, WGS, καθώς και πληροφορίες από την αλληλούχιση του RNA σε μεγάλου εύρους κοορτές μελανωμάτων διαφόρων σταδίων, σε συνδυασμό με την αυστηρή λειτουργική πιστοποίηση των υποψηφίων γονιδίων- κλειδιών για τη νόσο, θα βοηθήσουν στη δημιουργία ενός καταλόγου μεταλλάξεων και γενετικών συμβάντων, τα οποία θα είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην καθοδήγηση αλλά και στην κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς με μελάνωμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fauci et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2008; 83: 558- 564.
2. Du Vivier et al. *Atlas of Clinical Dermatology Du Vivier*. 2012; 11: 262- 277.
3. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, et al. **Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification**. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(36): 6199- 6206.
4. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. **Melanoma genetics and the development of rational therapeutics**. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115(4): 813- 824.
5. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, Carbone M, Leachman S, Sarin KY. **Familial skin cancer syndromes: Increased melanoma risk**. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016 Mar; 74(3): 423- 434.
6. Ribero S, Longo C, Glass D, Nathan P, Bataille V. **What Is New in Melanoma Genetics and Treatment?** *Dermatology*. 2016; 232(3): 259- 264.
7. Read J, Wadt KA, Hayward NK. **Melanoma genetics**. *Journal of Medical Genetics*. 2016; 53: 1- 14.
8. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, et al. **Update in genetic susceptibility in melanoma**. *Annals of Translational Medicine*. 2015; 3(15): 210.
9. Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. **The genomic landscape of cutaneous melanoma**. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2016 May; 29(3): 266- 283.
10. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, et al. **A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome**. *Nature*. 2010; 463(7278): 191- 196.
11. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, et al. **Personalized Oncology Through Integrative High-Throughput Sequencing: A Pilot Study**. *Science translational medicine*. 2011; 3(111): 111- 121.
12. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. **A Landscape of Driver Mutations in Melanoma**. *Cell*. 2012; 150(2): 251- 263.
13. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. **Exome sequencing identifies recurrent somatic *RAC1* mutations in melanoma**. *Nature genetics*. 2012; 44(9): 1006- 1014.
14. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. **Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer genes**. *Nature*. 2013; 499(7457): 214- 218.

15. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. **Signatures of mutational processes in human cancer.** *Nature*. 2013; 500(7463): 415- 421.
16. Watson et al. The Cancer Genome Atlas Network. **Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.** *Cell*. 2015; 161(7): 1681-1696.
17. Bardeesy N, Kim M, Xu J, et al. **Role of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in RAS-Driven Melanoma.** *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(10): 4176- 4188.
18. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. **Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma.** *Journal of Investigative Dermatology*. 2006 Jan; 126(1): 154- 160.
19. Ghosh P, Chin L. **Genetics and genomics of melanoma.** *Expert Review of Dermatology*. 2009; 4(2): 131.
20. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. **High frequency of BRAF mutations in nevi.** *Nature Genetics*. 2003 Jan; 33(1): 19- 20.
21. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature*. 2002 Jun 27; 417(6892): 949- 954.
22. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. **Distinct sets of genetic alterations in melanoma.** *The New England Journal of Medicine*. 2005 Nov 17; 353(20): 2135- 2147.
23. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, et al. **Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032.** *Journal of Translational Medicine*. 2010; 8: 67.

24. Wu H, Goel V, Haluska FG. **PTEN signaling pathways in melanoma.** *Oncogene*. 2003 May 19; 22(20): 3113- 3122.
25. Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. **Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma.** *Melanoma Research*. 2006 Apr; 16(2): 197- 200.
26. Roh MR, Gupta S, Park KH, Chung KY, Lauss M, Flaherty KT, Jönsson G, Rha SY, Tsao H. **Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival.** *Journal of Investigative Dermatology*. 2016 May; 136(5): 1002- 1011.
27. Dankort D, Curley DP, Cartledge RA, et al. **BRaf^{V600E} cooperates with Pten silencing to elicit metastatic melanoma.** *Nature genetics*. 2009; 41(5): 544- 552.
28. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. **Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma.** *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Sep 10; 24(26): 4340- 4346.
29. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Taideman J, Lambert J, Peeters M, Bracke M, Pauwels P, Brochez L. **EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target.** *Journal of Cutaneous Pathology*. 2011 Jun; 38(6): 492- 502.
30. Gross A, Niemetz-Rahn A, Nonnenmacher A, Tucholski J, Keilholz U, Fusi A. **Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway.** *Targeted Oncology*. 2015 Mar; 10(1): 77- 84.
31. Etnyre D, Stone AL, Fong JT, et al. **Targeting c-Met in melanoma: Mechanism of resistance and efficacy of novel combinatorial inhibitor therapy.** *Cancer Biology & Therapy*. 2014; 15(9): 1129- 1141.
32. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. **Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma.** *Nature*. 2005 Jul 7; 436(7047): 117- 122.
33. Villareal MO, Han J, Ikuta K, Isoda H. **Mechanism of Mitf inhibition and morphological differentiation effects of hirsein A on B16 melanoma cells revealed by DNA microarray.** *Journal of Dermatological Science*. 2012 Jul; 67(1): 26- 36.
34. Syed DN, Afaq F, Maddodi N, et al. **Inhibition of human melanoma cell growth by dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/ β -catenin signaling**

- and decreased Mitf levels.** *The Journal of investigative dermatology.* 2011; 131(6): 1291- 1299.
35. Hartman ML, Czyz M. **MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity.** *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2015; 72(7): 1249- 1260.
 36. Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. **Melanoma susceptibility genes and risk assessment.** *Methods in Molecular Biology.* 2014; 1102: 381- 393.
 37. Hansson J. **Familial cutaneous melanoma.** *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2010; 685: 134- 145.
 38. De Giorgi V, Savarese I, D'Errico A, Gori A, Papi F, Colombino M, Sini MC, Stanganelli I, Palmieri G, Massi D. **CDKN2A mutations could influence the dermoscopic pattern of presentation of multiple primary melanoma: a clinical dermoscopic genetic study.** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2015 Mar; 29(3): 574- 580.
 39. Criscito MC, Polsky D, Stein JA. **The Genetic Evolution of Melanoma.** *The New England Journal of Medicine.* 2016; 374: 993- 996.
 40. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. **The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions.** *The New England Journal of Medicine.* 2015; 373: 1926- 1936.
 41. Betti M, Aspesi A, Biasi A, Casalone E, Ferrante D, Ogliara P, Gironi LC, Giorgione R, Farinelli P, Grosso F, Libener R, Rosato S, Turchetti D, Maffè A, Casadio C, Ascoli V, Dianzani C, Colombo E, Piccolini E, Pavesi M, Miccoli S, Mirabelli D, Bracco C, Righi L, Boldorini R, Papotti M, Matullo G, Magnani C, Pasini B, Dianzani I. **CDKN2A and BAP1 germline mutations predispose to melanoma and mesothelioma.** *Cancer Letters.* 2016 Aug 10; 378(2): 120- 130.
 42. Smalley KSM, Lioni M, Palma MD, et al. **Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas.** *Molecular cancer therapeutics.* 2008; 7(9): 2876- 2883.
 43. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. **Melanoma: from mutations to medicine.** *Genes & Development.* 2012; 26(11): 1131- 1155.
 44. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. **Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue nevi.** *Nature.* 2009; 457(7229): 599- 602.

45. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. **Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma.** *Cancer Research*. 2002 Jun 1; 62(11): 3200- 3206.
46. Swope VB, Abdel-Malek ZA. **Significance of the Melanocortin 1 and Endothelin B Receptors in Melanocyte Homeostasis and Prevention of Sun-Induced Genotoxicity.** *Frontiers in Genetics*. 2016; 7: 146.
47. Chung H, Lee J, Jeong D, Han I-O, Oh E-S. **Melanocortin 1 Receptor Regulates Melanoma Cell Migration by Controlling Syndecan-2 Expression.** *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(23): 19326- 19335.
48. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. **POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma.** *Nature genetics*. 2014; 46(5): 478- 481.
49. Harland M, Petljak M, Robles-Espinoza CD, et al. **Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma.** *Familial Cancer*. 2016; 15: 139- 144.
50. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. **TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma.** *Science*. 2013 Feb 22; 339(6122): 959- 961.
51. Van der Weyden L, Patton EE, Wood GA, et al. **Cross-species models of human melanoma.** *The Journal of Pathology*. 2016; 238(2): 152- 165.
52. Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. **Epigenetic regulation in human melanoma: past and future.** *Epigenetics*. 2015; 10(2): 103- 121.
53. Griewank KG, Scolyer RA, Thompson JF, Flaherty KT, Schadendorf D, Murali R. **Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects.** *Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Feb; 106(2): djt435
54. Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. **Melanoma Epigenetics: Novel Mechanisms, Markers, and Medicines.** *Laboratory investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2014; 94(8): 822- 838.
55. Brien GL, Valerio DG, Armstrong SA. **Exploiting the Epigenome to Control Cancer-Promoting Gene-Expression Programs.** *Cancer Cell*. 2016 Apr 11; 29(4): 464- 476.
56. Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon DSB. **Epigenetic Biomarkers in Skin Cancer.** *Cancer Letters*. 2014; 342(2): 170- 177.

57. Martinez-Cardús A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL. **Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance.** *Annals of Translational Medicine.* 2015; 3(15): 209.
58. Vizoso M, Esteller M. **DNA methylation plasticity contributes to the natural history of metastasis.** *Cell Cycle.* 2015; 14(18): 2863- 2864.
59. Vizoso M, Ferreira HJ, Lopez-Serra P, et al. **Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR.** *Nature Medicine.* 2015; 21(7): 741- 750.
60. Lang D, Mascarenhas JB, Shea CR. **Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells.** *Clinics in Dermatology.* 2013; 31(2): 166- 178.
61. Tiffen J, Gallagher SJ, Hersey P. **EZH2: an emerging role in melanoma biology and strategies for targeted therapy.** *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2015 Jan; 28(1): 21- 30.
62. Barsotti AM, Ryskin M, Zhong W, et al. **Epigenetic reprogramming by tumor-derived EZH2 gain-of-function mutations promotes aggressive 3D cell morphologies and enhances melanoma tumor growth.** *Oncotarget.* 2015; 6(5): 2928- 2938.
63. Asangani IA, Harms PW, Dodson L, et al. **Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma.** *Oncotarget.* 2012; 3(9): 1011- 1025.
64. Guo X, Xu Y, Zhao Z. **In-depth genomic data analyses revealed complex transcriptional and epigenetic dysregulations of BRAFV600E in melanoma.** *Molecular Cancer.* 2015; 14: 60.
65. Wang J, Huang SK, Marzese DM, et al. **Epigenetic Changes of EGFR play an important role in BRAF inhibitor Resistant Cutaneous Melanomas.** *The Journal of investigative dermatology.* 2015; 135(2): 532- 541.
66. Spagnolo F, Ghiorzo P, Queirolo P. **Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma.** *Oncotarget.* 2014; 5(21): 10206- 10221.
67. Konstantinov NK, Ulf-Møller CJ, Dimitrov S. **Histone variants and melanoma: facts and hypotheses.** *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2016 Jul; 29(4): 426- 433.
68. Howell PM Jr, Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker AI. **Epigenetics in human melanoma.** *Cancer Control.: Journal of the Moffitt Cancer Center.* 2009 Jul; 16(3): 200- 218.

69. Mannavola F, Tucci M, Felici C, Stucci S, Silvestris F. **miRNAs in melanoma: a defined role in tumor progression and metastasis.** *Expert Review of Clinical Immunology*. 2016; 12(1): 79- 89.
70. Aftab MN, Dinger ME, Perera RJ. **The role of microRNAs and long non-coding RNAs in the pathology, diagnosis, and management of melanoma.** *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 0: 60- 70.
71. Latchana N, Ganju A, Howard JH, Carson WE. **MicroRNA dysregulation in melanoma.** *Surgical Oncology*. 2016 Sep; 25(3): 184- 189.
72. Mirzaei H, Gholamin S, Shahidsales S, Sahebkar A, Jaafari MR, Mirzaei HR, Hassanian SM, Avan A. **MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma.** *European Journal of Cancer*. 2016 Jan; 53: 25- 32.
73. Tong AW, Nemunaitis J. **Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?** *Cancer Gene Therapy*. 2008 Jun; 15(6): 341- 355.
74. Kakavand H, Wilmott JS, Long GV, Scolyer RA. **Targeted therapies and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma patients: a guide and update for pathologists.** *Pathology*. 2016 Feb; 48(2): 194- 202.
75. Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS, Perera RJ. **The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion.** *Cancer Research*. 2011 Jun 1; 71(11): 3852- 3862.
76. Laville V, Clerc SL, Ezzedine K, Jdid R, Taing L, Labib T, Coulonges C, Ulveling D, Carpentier W, Galan P, Hercberg S, Morizot F, Latreille J, Malvy D, Tschachler E, Zagury JF. **A genome-wide association study in Caucasian women suggests the involvement of HLA genes in the severity of facial solar lentigines.** *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2016 Sep; 29(5): 550- 558.
77. Schmidt K, Joyce CE, Buquicchio F, et al. **The lncRNA SLNCR1 mediates melanoma invasion through a conserved SRA1-like region.** *Cell Reports*. 2016; 15(9): 2025- 2037.
78. Leucci E, Coe EA, Marine JC, Vance KW. **The emerging role of long non-coding RNAs in cutaneous melanoma.** *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2016 Sep 8. [Epub ahead of print]
79. Kong BY, Menzies AM, Saunders CA, Liniker E, Ramanujam S, Guminski A, Kefford RF, Long GV, Carlino MS. **Residual FDG-PET metabolic activity in metastatic**

- melanoma patients with prolonged response to anti-PD-1 therapy.** *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2016 Sep; 29(5): 572- 577.
80. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW, Polsky D. **ABCDE--an evolving concept in the early detection of melanoma.** *Arch Dermatol.* 2005; 141: 1032.
 81. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. **Management of cutaneous melanoma.** *The New England Journal of Medicine.* 2004 Sep 2; 351(10): 998- 1012.
 82. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, *et al.* **Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma.** *The New England Journal of Medicine.* 2006; 355(13): 1307- 1317.
 83. Van der Ploeg AP, Van Akkooi AC, Haydu LE, Scolyer RA, Murali R, Verhoef C, Thompson JF, Eggermont AM. **The prognostic significance of sentinel node tumour burden in melanoma patients: an international, multicenter study of 1539 sentinel node-positive melanoma patients.** *European Journal of Cancer.* 2014 Jan; 50(1): 111- 120.
 84. Kirkwood JM, Manola J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff MS, Rao U. **A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma.** *Clinical Cancer Research.* 2004 Mar 1; 10(5): 1670- 1677.
 85. Eggermont AM, Suci S, Testori A, Santinami M, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Salès F, Dummer R, Robert C, Schadendorf D, Patel PM, de Schaetzen G, Spatz A, Keilholz U. **Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma.** *Journal of Clinical Oncology.* 2012 Nov 1; 30(31): 3810- 3818.
 86. Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, Esteva FJ, Gonzalez-Angulo AM, Krop I, Levinson J, Lin NU, Modi S, Patt DA, Perez EA, Perlmutter J, Ramakrishna N, Winer EP. **Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline.** *Journal of Clinical Oncology.* 2014 Jul 1; 32(19): 2078- 2099.
 87. Ribero S, Longo C, Glass D, Nathan P, Bataille V. **What Is New in Melanoma Genetics and Treatment?** *Dermatology.* 2016; 232(3): 259- 264.
 88. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urban

- WJ. **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** *The New England Journal of Medicine*. 2010 Aug 19; 363(8): 711- 23.
89. Wolchok JD, Weber JS, Hamid O, Celeste Lebbé, Michele Maio, Dirk Schadendorf, Veerle de Pril, Kevin Heller, Tai-Tsang Chen, Ramy Ibrahim, Axel Hoos, Steven J. O'Day. **Ipilimumab efficacy and safety in patients with advanced melanoma: a retrospective analysis of HLA subtype from four trials.** *Cancer Immunity: a Journal of the Academy of Cancer Immunology*. 2010 ;10: 9.
 90. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, et al. **Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab.** *Journal of Clinical Oncology*. 2014; 32(10): 1020- 1030.
 91. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. **Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma.** *The New England journal of medicine*. 2013; 369(2): 134- 144.
 92. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu WJ, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Li XN, Iannone R, Ebbinghaus SW, Kang SP, Daud A. **Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial.** *The Lancet*. 2014 Sep 20; 384(9948): 1109- 1117.
 93. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. **Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.** *The New England Journal of Medicine*. 2012 Jun 28; 366(26): 2443- 2454.
 94. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS. **Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma.** *The New England Journal of Medicine* 2015; 372(21): 2006- 2017.

95. Henricks LM, Schellens JH, Huitema AD, Beijnen JH. **The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology.** *Cancer Treatment Reviews.* 2015 Dec; 41(10): 859- 867.
96. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature.* 2002 Jun 27; 417(6892): 949- 954.
97. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; **Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.** *Cell.* 2004 Mar 19; 116(6): 855- 867.
98. Houben R, Becker JC, Kappel A, et al. **Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis.** *Journal of Carcinogenesis.* 2004; 3: 6.
99. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. **The BRAF–MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells.** *The Journal of Experimental Medicine.* 2006; 203(7): 1651- 1656.
100. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K, Flaherty K. **Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma.** *The New England Journal of Medicine.* 2014; 371(20): 1877- 1888.
101. Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, et al. **Phase II, Open-Label, Randomized Trial of the MEK1/2 Inhibitor Selumetinib as Monotherapy versus Temozolomide in Patients with Advanced Melanoma.** *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2012; 18(2): 555- 567.

102. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA **Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.** *The New England Journal of Medicine*. 2011 Jun 30; 364(26): 2507- 2516.
103. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH Jr, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. **Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.** *The Lancet*. 2012 Jul 28; 380(9839): 358- 365.
104. Agarwala SS, Kirkwood JM, Gore M, Dreno B, Thatcher N, Czarnecki B, Atkins M, Buzaid A, Skarlos D, Rankin EM. **Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study.** *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Jun 1; 22(11): 2101- 2107.
105. Long GV, Trefzer U, Davies MA, Kefford RF, Ascierto PA, Chapman PB, Puzanov I, Hauschild A, Robert C, Algazi A, Mortier L, Tawbi H, Wilhelm T, Zimmer L, Switzky J, Swann S, Martin AM, Guckert M, Goodman V, Streit M, Kirkwood JM, Schadendorf D. **Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial.** *The Lancet Oncology*. 2012 Nov; 13(11): 1087- 1095.
106. Larkin J, Del Vecchio M, Ascierto PA, Krajsova I, Schachter J, Neyns B, Espinosa E, Garbe C, Sileni VC, Gogas H, Miller WH Jr, Mandalà M, Hospers GA, Arance A, Queirolo P, Hauschild A, Brown MP, Mitchell L, Veronese L, Blank CU. **Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutated metastatic melanoma: an open-label, multicentre, safety study.** *The Lancet Oncology*. 2014 Apr; 15(4): 436- 444.
107. Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, et al. **RAS Mutations Are Associated With the Development of Cutaneous Squamous Cell Tumors in Patients Treated With RAF Inhibitors.** *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 30(3): 316- 321.
108. Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. **Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma.** *Annals of Translational Medicine*. 2016; 4(12): 237.

109. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D. **Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma.** *The New England Journal of Medicine*. 2012 Jul 12; 367(2): 107- 114.
110. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA 3rd, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. **Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations.** *The New England Journal of Medicine*. 2012 Nov; 367(18): 1694- 1703
111. Shiiyama R, Fukushima S, Jinnin M, Yamashita J, Miyashita A, Nakahara S, Kogi A, Aoi J, Masuguchi S, Inoue Y, Ihn H. **Sensitive detection of melanoma metastasis using circulating microRNA expression profiles.** *Melanoma Research*. 2013 Oct; 23(5): 366- 372.
112. Kozubek J, Ma Z, Fleming E, et al. **In-Depth Characterization of microRNA Transcriptome in Melanoma.** Slominski AT, ed. *PLoS ONE*. 2013; 8(9): e72699.
113. Li P, He Q, Luo C, Qian L. **Circulating miR-221 Expression Level and Prognosis of Cutaneous Malignant Melanoma.** *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2014; 20: 2472- 2477.
114. Tian R, Liu T, Qiao L, Gao M, Li J. **Decreased serum microRNA-206 level predicts unfavorable prognosis in patients with melanoma.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015; 8(3): 3097- 3103.
115. Reuland SN, Smith S, Bemis L, et al. **MicroRNA-26a is Strongly Down-regulated in Melanoma and Induces Cell Death through Repression of Silencer of Death Domains (SODD).** *The Journal of Investigative Dermatology*. 2013; 133(5): 1286- 1293.
116. Sun V, Zhou WB, Majid S, Kashani-Sabet M, Dar AA. **MicroRNA-mediated regulation of melanoma.** *The British Journal of Dermatology*. 2014 Aug; 171(2): 234- 241.

117. Segura MF, Greenwald HS, Hanniford D, Osman I, Hernando E. **MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy.** *Carcinogenesis*. 2012; 33(10): 1823- 1832.
118. Glud M, Gniadecki R. **MicroRNAs in the pathogenesis of malignant melanoma.** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2013 Feb; 27(2): 142- 150.
119. Bonazzi VF, Stark MS, Hayward NK. **MicroRNA regulation of melanoma progression.** *Melanoma Research*. 2012 Apr; 22(2): 101- 113.
120. Wagenseller AG, Shada A, D'Auria KM, et al. **MicroRNAs induced in melanoma treated with combination targeted therapy of Tamsirolimus and Bevacizumab.** *Journal of Translational Medicine*. 2013; 11: 218.
121. Luo C, Weber CE, Osen W, Bosserhoff AK, Eichmüller SB. **The role of microRNAs in melanoma.** *European Journal of Cell Biology*. 2014 Jan-Feb; 93(1-2): 11- 22.
122. Leibowitz-Amit R, Sidi Y, Avni D. **Aberrations in the micro-RNA biogenesis machinery and the emerging roles of micro-RNAs in the pathogenesis of cutaneous malignant melanoma.** *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2012 Nov; 25(6): 740- 757.
123. Kunz M. **MicroRNAs in melanoma biology.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013; 774: 103- 120.
124. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, et al. **The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma.** *Cancer discovery*. 2014;4(1):94-109.
125. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, et al. **Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K.** *Cancer cell*. 2010; 18(6): 683- 695.
126. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. **RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E).** *Nature*. 2011; 480(7377): 387- 390.
127. Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. **Melanomas acquire resistance to B-RF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.** *Nature*. 2010; 468(7326): 973- 977.

128. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, et al. **COT/*MAP3K8* drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation.** *Nature*. 2010; 468(7326): 968- 972.